





MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA CURSO DE MESTRADO EM ZOOLOGIA

Filogeografia do lagarto *Kentropyx calcarata* Spix 1825 (Reptilia: Teiidae) na Amazônia Oriental

ÁUREA AGUIAR CRONEMBERGER

Belém-PA 2015

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA CURSO DE MESTRADO EM ZOOLOGIA

Filogeografia do lagarto *Kentropyx calcarata* Spix 1825 (Reptilia: Teiidae) na Amazônia Oriental

ÁUREA AGUIAR CRONEMBERGER

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Zoologia, Curso de Mestrado do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Zoologia.

Orientadora: Dra. Teresa Cristina S. Ávila Pires Co-orientadora: Dra. Fernanda P. Werneck

ÁUREA AGUIAR CRONEMBERGER

Filogeografia do lagarto *Kentropyx calcarata* Spix 1825 (Reptilia: Teiidae) na Amazônia Oriental

Dra. Teresa C. S. de Ávila-Pires, **Orientadora** Museu Paraense Emílio Goeldi

Dra. Fernanda de Pinho Werneck, **Coorientadora** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Lilian Gimenes Giugliano (UNB)

Dr. Péricles Sena do Rego (UFPA)

Pedro Luiz Vieira del Peloso (UFPA)

Marcelo Coelho Miguel Gehara (UFRN)

Fernando Mendonça d'Horta (USP)

Belém, Pará, fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora (TC) por todo o apoio, sempre disposta a me ajudar, me recebendo em sua sala, pacientemente, para esclarecer minhas dúvidas.

À minha coorientadora Fernanda Werneck, por todo o auxílio concedido durante o desenvolvimento do trabalho, seja conseguindo mais amostras ou pelos inúmeros e-mails que trocamos, acerca das análises.

À Dra Ana Prudente por confiar em mim, logo quando cheguei em Belém em 2012, concedendo-me uma bolsa DTI para organizar a coleção de tecidos da herpetologia. Através dessa bolsa, também pude aprender algumas atividades no Laboratório de Biologia Molecular. Obrigada, Aninha!

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará pelo fornecimento de todas as instalações e ferramentas necessárias para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca da qualificação (Iracilda Sampaio, Péricles Sena e Cazuza) pelas importantes considerações.

Aos meus inesquecíveis amigos do Museu, principalmente aos que me ajudaram no momento mais difícil que vivi aqui em Belém, agradeço de coração todo o apoio, sensibilidade e carinho. Em especial, Gabriela e Pablo, por nos acolherem tão bem na casa deles, enquanto não conseguia superar meu trauma. Muito Obrigada!

Aos amigos: Luciana, Marcélia, Adriano, Marcelo, Fernanda, Annelise, Ana Paula, André, João, Isabella, Fabrício, Alexandre Ascenso, Mel, Alexandre Missassi, Lywout, Jerriane, e Pedro, do laboratório de herpetologia; e do laboratório de biologia molecular: Laís, Antonita, Tânia, Nayron, Lucas, Ana Kelly, Leonardo Miranda, Leonardo Moura, Lincoln, Marcela, Tibério, Sofia, Gilmax, Bernardo, Bárbara, Joiciane, Cínthia, Ângelo e Bruno. De alguma forma, todos me apoiaram e me ajudaram ao longo do mestrado, seja por algum auxílio durante os procedimentos laboratoriais, ou com relação a alguma análise, pela troca de conhecimentos ou pelo simples fato de compartilharem comigo momentos de alegria e descontração com altas doses de risadas diárias.

Por fim, e principalmente, gostaria de agradecer à minha família, em especial aos meus pais, por não medirem esforços quando o assunto é a minha felicidade e, sobretudo, por me ensinarem desde sempre a não buscar ser a melhor, mas a dar o melhor de mim; Ao Geraldo, agradeço pelo companheirismo, respeito, amizade e parceria que já duram quase oito anos. Obrigada por transmitir a paz que preciso, e por ser sempre paciente comigo.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Espécie foco do estudo: Kentropyx calcarata Spix 1825	5
1.2 Hipóteses de diversificação da biodiversidade amazônica e suas consequências	8
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Amostragem e obtenção de dados moleculares	12
2.2 Inferências filogenéticas	14
2.3 Análises populacionais	15
2.4 Tempos de divergência e dinâmica demográfica	17
3 RESULTADOS	20
3.1 Composição e saturação do banco de dados	20
3.2 Inferências filogenéticas	21
3.3 Inferências populacionais	24
3.4 Tempos de divergência	30
3.5 Dinâmica demográfica	32
3.6 Análise sobre deslocamento de caracter	34
4 DISCUSSÃO	35
4.1 Inferências filogenéticas e populacionais	36
4.2 Datação molecular	38
4.3 História demográfica	40
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
Anexo 1	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 3 – Exemplar de Kentropyx calcarata. Reserva Utinga, Belém-PA. Foto: P. V. Cerqueira...... 5

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da PCR e primers utilizados no estudo.13

Tabela 2 – Panorama geral dos dados genéticos. mt = DNA mitocondrial; nu = DNA nuclear; Si = número de sítios variáveis; Pb = quantidade de pares de base; N = número de amostras amplificadas; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; k = número de sítios polimórficos; S = número de sítios segregantes......21

RESUMO

Kentropyx calcarata é um lagarto heliófilo, florestal e que habita preferencialmente regiões próximas a igarapés, clareiras naturais ou em bordas de florestas. Possui ampla distribuição na Amazônia central e oriental, abrangendo os países Guyana, Guiana Francesa, Suriname e Brasil, onde além da Amazônia ocorre no nordeste e oeste do Cerrado e em parte da Floresta Atlântica. Estudos anteriores envolvendo K. calcarata apontam uma estruturação geográfica para a espécie, a qual ainda necessita ser melhor investigada. Neste estudo, foi analisado como as populações dessa espécie se estruturam ao longo de sua distribuição na Amazônia e quais os possíveis eventos envolvidos no processo de diversificação. Foram utilizados dois marcadores mitocondriais (16S e Cytb) e dois nucleares (DNAH3 e SINCAIP) para testar as hipóteses dos rios como barreiras e dos refúgios florestais. Além disso, foi verificada a possibilidade de haver deslocamento de caracter em populações simpátricas a K. altamazonica. As linhagens inferidas a partir das análises filogenéticas mostram-se estruturadas, do ponto de vista genético e limitadas pelos principais rios da Amazônia oriental. Algumas populações apresentaram um cenário demográfico que condiz com uma expansão populacional recente, que pode estar relacionado com o período de expansão da área florestal.

Palavras-chave: Filogeografia, *Kentropyx calcarata*, Amazônia oriental, Estrutura populacional.

1 INTRODUÇÃO

Estudos filogeográficos associam dados de filogenia aos padrões de distribuição das espécies, a fim de reconstruir a história evolutiva de linhagens genealógicas no tempo e espaço (Avise, 1998; Hickerson *et al.*, 2011). Este tipo de estudo é importante, pois torna possível avaliar processos evolutivos que possam ter resultado na estruturação populacional das espécies estudadas (Avise, 1998, 2009; Bermingham & Moritz, 1998).

A floresta amazônica forma um dos maiores e mais complexos ecossistemas tropicais do mundo, e estudos filogeográficos que visam testar cenários evolutivos complexos e hipóteses de diversificação no bioma tem crescido nas últimas décadas. Eventos geológicos do Mioceno têm sido considerados como determinantes no processo de diversificação de vários grupos de vertebrados da América do Sul (Giugliano *et al.*, 2007; Werneck *et al.*, 2009; Maciel *et al.*, 2010). O soerguimento dos Andes, iniciado nesse período e estendendo-se até o Plioceno, alterou padrões de clima e de drenagem no norte da América do Sul (Hoorn *et al.*, 2010) e pode ter tido forte influencia na diversificação da biota na região. Com o estabelecimento do atual sistema de drenagem, o rio Amazonas e seus principais afluentes podem ter atuado como barreiras primárias à dispersão de espécies, levando a eventos de especiação por vicariância e gerando linhagens-irmãs alopátricas em interflúvios contíguos. Essa hipótese (rios como barreiras) foi a primeira a ser proposta para diversificação de grupos na Amazônia, inicialmente com relação aos rios Amazonas, Negro e Madeira (Wallace, 1852), mais recentemente sendo estendida a todos os principais afluentes do Amazonas.

Outra hipótese bastante discutida é a dos refúgios florestais, a qual pressupõe que alterações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno teriam promovido ciclos de expansão e retração das áreas florestais (ou savânicas) e, com isso, teriam limitado as populações associadas em refúgios isolados por ambientes savânicos (ou florestais) (Haffer, 1969). Nesse caso, os rios representariam barreiras secundárias à expansão das espécies ou populações.

Ainda que as propostas iniciais tenham visto estas e outras hipóteses como antagônicas, os estudos já feitos apontam para uma história longa e complexa na Amazônia, com vários eventos repercutindo de maneiras diferenciadas em diversas áreas e em tempos distintos (Hoorn *et al.*, 2010), assim como com vários organismos respondendo diferentemente a esses eventos (p.ex., Aleixo, 2004, 2006; Avila-Pires *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2012; Tuchetto-Zolet *et al.*, 2013).

Patton *et al.* (1994) foram os primeiros a desenvolver trabalhos com uma abordagem filogeográfica na Amazônia, com o objetivo de testar a hipótese dos rios como barreira em relação a populações de algumas espécies de mamíferos na parte sul-ocidental da Amazônia brasileira (Patton & Silva, 1998; Patton *et al.*, 1994, 1996, 2000; Silva & Patton, 1998). Mais recentemente, estudos de filogeografia passaram a ser desenvolvidos abrangendo a Amazônia oriental ou toda a bacia (p.ex., Hall & Harvey, 2002; Ribas & Miyaki, 2004; Ribas *et al.*, 2005; Wuster *et al.*, 2005; Quijada-Mascareñas *et al.*, 2007; Geurgas e Rodrigues, 2010; Avila-Pires *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2012; Maldonado-Coelho *et al.*, 2013; Thom e Aleixo, 2015). Dentre esses estudos, quatro envolveram répteis Squamata (Wuster *et al.*, 2005; Quijada-Mascareñas *et al.*, 2010; Avila-Pires *et al.*, 2007; Geurgas e Rodrigues, 2010;

Nesse contexto, o estudo de filogeografia desenvolvido por Avila-Pires *et al.* (2012) foi realizado no leste da Amazônia, na região do baixo curso dos rios Amazonas e Tocantins, envolvendo as espécies de lagarto *Gonatodes humeralis* (Guichenot 1855) e *Kentropyx calcarata* Spix 1825 (Figura 1). O objetivo do trabalho foi testar a congruência entre o cenário geológico proposto para a região por Rossetti & Valeriano (2007) e a estrutura filogeográfica das populações de cada uma dessas espécies, com base nos genes mitocondriais citocromo B (Cytb) e 16S.



Figura 1 – (A) Representação geográfica das amostras de *Kentropyx calcarata* (círculos) e *Gonatodes humeralis* (quadrados) utilizadas no estudo de Avila-Pires *et al.*, (2012). As estrelas representam os locais onde ocorrem amostras de ambas as espécies. (B) Cladograma hipotético de área construído a partir de dados geológicos. Os nós do cladograma correspondem às barreiras geográficas (linhas tracejadas da figura A, e a idade aproximada da separação entre as áreas ou grupos de áreas. Fonte: Avila-Pires *et al.* (2012).

De acordo com o cenário proposto por Ávila-Pires *et al.* (2012) e sumarizado na figura 1, o rio Amazonas teria atuado como barreira pelo menos a partir do Plioceno (evento 1). Posteriormente, há aproximadamente 2,5 milhões de anos (idade estimada a partir da datação da sedimentação) o paleo-Tocantins (que seguiria na direção nor–noroeste [NNW] até sua foz no oceano Atlântico) teria surgido e separado populações a leste e a oeste de seu curso (evento 2). Mais recentemente, há mais ou menos 6.8 mil anos, o rio teria se deslocado em direção nor–nordeste (NNE), alcançando sua posição atual. Tal deslocamento levou à separação das populações que atualmente ocupam a Ilha do Marajó daquelas a leste do rio Tocantins (evento 3). O Marajó, por sua vez, só veio a se estabelecer completamente como ilha no Holoceno, após o surgimento do rio Pará.

Os resultados obtidos para *K. calcarata*, diferentemente de *G. humeralis*, mostraram estruturação genética parcialmente congruente com o cenário geológico previsto (Figura 2), com alguns rios podendo ter atuado como fatores limitantes ao fluxo gênico. Por exemplo, o

rio Amazonas pode ter ocasionado o primeiro evento de separação entre as populações (Figura 2: linhagem *If* se diferenciando das demais linhagens;), ainda que aparentemente tenham ocorrido eventos de dispersão posteriores; e o paleo-Tocantins pode ter isolado populações a leste e oeste de seu curso (Figura 2: Ib[+Ia] e *Ic*). Entretanto, os nós mais basais do cladograma obtido apresentaram baixo suporte estatístico, indicando a necessidade de estudos aprofundados, com amostragens geográficas mais densas e utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares.



Figura 2 – Árvore de Inferência Bayesiana dos genes 16S e citocromo B concatenados para *Kentropyx calcarata*. Os haplótipos terminais foram substituídos pelas localidades correspondentes, seguido de uma letra (quando há mais de um haplótipo por localidade) Os agrupamentos representados por linhas contínuas no cladograma e no mapa possuem suportes estatísticos de probabilidade posterior (à esquerda) superiores a 70% e valores de *bootstrap* (à direita) acima de 50% (dentro dos círculos). As linhas tracejadas indicam grupos suportados por valores moderados de probabilidade posterior (em hexágonos na árvore). As linhas pontilhadas indicam baixos valores de probabilidade posterior (retângulos na árvore). Fonte: Avila-Pires *et al.* (2012).

1.1 Espécie foco do estudo: Kentropyx calcarata Spix 1825

Kentropyx calcarata (Figura 3) é um lagarto da família Teiidae, que possui hábito heliófilo, sendo encontrado tipicamente em ambientes florestais (florestas primárias e secundárias, embora tenha alguma tolerância à ambientes degradados). Habita preferencialmente regiões próximas a igarapés, clareiras naturais, bordas de florestas, onde forrageia ativamente sobre o solo, ramos ou galhos, troncos caídos, alimentando-se de pequenos invertebrados (Vitt, 1991; Avila-Pires, 1995). Reproduz-se durante grande parte do ano, produzindo de quatro a dez ovos por ninhada, depositando-os geralmente em áreas arenosas expostas ao sol, ao longo das margens de córregos (Vitt, 1991). Distribui-se na Amazônia central e oriental, no Brasil, Guiana, Guiana Francesa e Suriname. No Brasil, além da região amazônica, *K. calcarata* ocorre na porção nordeste e oeste do Cerrado e também em parte da Floresta Atlântica (Avila-Pires, 1995).



Figura 3 – Exemplar de Kentropyx calcarata. Reserva Utinga, Belém-PA. Foto: P. V. Cerqueira.

As espécies florestais amazônicas do gênero *Kentropyx* — *K. calcarata, K. pelviceps* Cope, 1868 e *K. altamazonica* Cope, 1876 — foram agrupadas por Gallagher & Dixon (1992) no grupo *calcarata*. Werneck *et al.* (2009), a partir de dados morfológicos e moleculares (genes 12S e 16S), corroboraram a proximidade filogenética entre essas espécies, inferindo *K. calcarata* como espécie-irmã de *K. pelviceps*, e este clado como irmão de *K. altamazonica*. A origem do gênero *Kentropyx* Spix, 1825 foi estimada como tendo ocorrido no Terciário, na transição Oligoceno-Mioceno, e sua diversificação principalmente durante o Mioceno (Werneck *et al.*, 2009). Além disso, o estudo incluiu dois exemplares de *K. calcarata*, um da Guyana e o outro do Mato Grosso, estimando que as populações dessa espécie tenham começado a divergir no Plioceno a 3.4 milhões de anos atrás (Ma) (Figura 4).



Figura 4 – Cronograma da evolução de *Kentropyx*, com base em dados morfológicos e moleculares combinados numa inferencia Bayesiana. As barras em cinza indicam os tempos de divergência (média \pm desvio padrão) estimados a partir de relógio molecular relaxado. Reproduzido de Werneck *et al.* (2009).

Gallagher *et al.* (1986), analisando a variação geográfica entre as espécies do grupo *calcarata* com base em dados morfológicos, constataram que uma população de *K. calcarata* da porção central da Amazônia, em simpatria com *K. altamazonica* (Figura 5: A), apresentava caracteres divergentes em relação às demais populações. De acordo com as análises de agrupamento realizadas (Figura 5: B), a população de *K. calcarata* em simpatria com *K. altamazonica* (população 7) apresentou maiores similaridades morfológicas com populações de *K. pelviceps* do que com as demais populações de *K. calcarata*. Os autores levantaram a hipótese de que a divergência morfológica dessa população teria sido ocasionada por deslocamento de caráter (*character displacement*), como resultado da competição com *K. altamazonica*.



Figura 5 – Mapa indicando a distribuição das espécies do grupo *calcarata*: As áreas listradas indicam a ocorrência de *Kentropyx calcarata*, as de coloração preta representam *K. pelviceps* e as não preenchidas *K. altamazonica*. A seta vermelha aponta para a população 7 de *K. calcarata* em simpatria com *K. altamazonica*. Ao lado, o gráfico representa a análise de agrupamento quanto à similaridade morfológica entre as populações do grupo *calcarata*. Os números inseridos no quadrado representam as populações de *K. altamazonica*, nos círculos preenchidos *K. calcarata* e nos círculos não preenchidos *K. pelviceps*. Fonte: Gallagher *et al.*, (1986).

Assim, através de diferentes conjuntos de dados morfológicos e moleculares, Gallagher *et al.* (1986), Werneck *et al.* (2009) e Avila-Pires *et al.* (2012) demonstram que *K. calcarata* apresenta uma forte estruturação geográfica, a qual contudo, a origem e a natureza dessa estruturação ainda necessita ser melhor investigada. Entender como as populações dessa espécie se estruturam ao longo de toda sua área de ocorrência na Amazônia permitirá um melhor entendimento dos processos que levaram a tal diversificação.

1.2 Hipóteses de diversificação da biodiversidade amazônica e suas consequências

É praticamente consenso que a evolução da paisagem amazônica atual foi estruturada, basicamente, por eventos geomorfológicos e climáticos ocorridos durante o Terciário e Quaternário. Esses eventos geomorfológicos incluem flutuações no nível do mar, incursões marinhas, formação de arcos geológicos, soerguimento dos Andes e consequente alteração da dinâmica do sistema fluvial. As variações climáticas, por sua vez, ocasionaram, dentre outras transformações, mudanças na vegetação. Esses eventos geraram cenários complexos para a diversificação das espécies, levando à proposição de várias hipóteses biogeográficas (Silva & Patton, 1998; Haffer & Prance, 2001; Rossetti *et al.*, 2005; Rossetti & Mann de Toledo, 2007; Hoorn *et al.*, 2010; Wesselingh *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013).

Dentre as diversas hipóteses propostas, duas destacam-se por serem mais facilmente testáveis e por apresentarem predições mais generalizadas acerca dos fatores climáticos (hipótese dos refúgios) e geotectônicos (hipótese dos rios) responsáveis pela diversificação dos vertebrados amazônicos (Moritz *et al.*, 2000). A hipótese dos rios como barreira assume que o Amazonas e seus principais tributários possam ter atuado como barreira à dispersão de espécies, isolando populações em margens opostas e levando à diferenciação das linhagens e, em última instância, à especiação. Neste caso, o surgimento do rio representaria o evento vicariante, ou seja, a barreira primária que levou à especiação.

As principais predições da hipótese dos rios podem ser testadas através de ferramentas filogenéticas e abordagens de genética de populações (Funk *et al.*, 2007). As premissas dessa hipótese envolvem a formação de agrupamentos monofiléticos recíprocos e forte estruturação populacional entre as margens opostas dos rios, após a remoção do efeito da distância geográfica (Sick, 1967; Moritz *et al.*, 2000; Funk *et al.*, 2007). Os indivíduos situados nas

margens opostas, mais próximos à foz dos rios, tendem a apresentar maiores níveis de diferenciação genética do que nas regiões mais próximas das nascentes (Gascon *et al.*, 2000; Leite & Rogers, 2013). Presume-se também, que as populações separadas pelos rios encontrem-se estáveis, sem apresentar indícios de expansão populacional (Batalha-Filho *et al.*, 2013).

Dos estudos filogeográficos com répteis Squamata com foco na Amazônia, Henderson et al. (2009) e Avila-Pires et al. (2012) abordaram a hipótese dos rios como barreira, indicando que alguns rios amazônicos podem limitar populações em suas margens opostas. Vale ainda ressaltar que algumas espécies de lagartos possuem distribuições cujos limites coincidem com a presença de alguns rios amazônicos—*Plica plica* (Linnaeus, 1758) é limitada a leste pelo rio Tocantins; as populações ao sul do Amazonas de *Arthrosaura kockii* (Lidth de Jeude, 1904), *Tretioscincus agilis* (Ruthven, 1916) e *Gonatodes nascimentoi* Sturaro & Avila-Pires, 2011 são limitadas a oeste, ao sul do Amazonas, pelo rio Xingu; *Gonatodes tapajonicus* Rodrigues, 1980 restringe-se ao interflúvio Tapajós–Xingu, *Anolis phyllorhinus* Myers & Carvalho, 1945 ao interflúvio Madeira–Tapajós (Avila-Pires, 1995; Sturaro & Avila-Pires, 2011).

Com relação ao clima, os ciclos glaciais ocorridos durante o Pleistoceno teriam provocado, de acordo com Haffer (1969) e Vanzolini e Williams (1970), fragmentações nas áreas florestais (que formariam vários agrupamentos isolados por vegetação savânica) durante os períodos glaciais, mais secos, e expansão dessas áreas de refúgios florestais em épocas de clima quente e úmido, quando formariam novamente uma área contínua. Dessa forma e sob um tempo de isolamento suficiente para acumular variabilidade genética, populações associadas aos ambientes de refúgio estariam submetidas a um processo alopátrico de diversificação. Esta hipótese, também conhecida como hipótese dos refúgios florestais pleistocênicos, foi reformulada posteriormente, e ao modelo de refúgio foi acrescentado que as alterações climáticas teriam se estendido pelo Neógeno, impulsionadas pelos ciclos de Milankovitch (Haffer e Prance, 2001; Haffer, 2008). Nessa nova versão, o número e tamanho dos refúgios não foram definidos, nem o(s) tipo(s) de vegetação (floresta seca, aberta, savana, ou algo intermediário) separando os refúgios de floresta úmida.

As consequências apontadas para a hipótese dos refúgios, segundo Aleixo (2004) e Moritz *et al.* (2000), envolvem indícios de estruturação populacional entre as linhagens (que agora podem estar em contato secundário) nas supostas áreas de refúgios florestais, assim como sinais de expansão demográfica recente entre as populações que, nesse caso, poderiam estar limitadas por outras barreiras (secundárias), como por exemplo os rios amazônicos. Os sinais de expansão populacional podem ser demonstrados por uma baixa diversidade genética e pouca estruturação filogeográfica entre as populações (Aleixo, 2004). Além disso, a datação dos eventos vicariantes deverá ser congruente com os períodos dos máximos glaciais.

Existem diversas outras hipóteses biogeográficas propostas para a evolução da paisagem amazônica, como gradientes ecológicos, incursões marinhas, dentre outras hipóteses paleogeográficas (Ribas *et al.*, 2012; Leite & Rogers, 2013). No entanto, nem todas se aplicam à história filogeográfica de *K. calcarata*, visto que tratam de eventos relativamente mais antigos. Ou ainda, o teste dessas hipóteses requer uma abordagem que incorpore a composição da paisagem e um conhecimento acerca das variações clinais do ambiente. *Kentropyx calcarata* é um bom modelo para testar as hipóteses dos rios como barreiras e dos refúgios florestais, devido à ampla distribuição englobando os vários rios da Amazônia oriental como possíveis barreiras às suas populações, por apresentar estrutura geográfica detectada em estudos anteriores, além de ser uma espécie de ambiente predominantemente florestal (ainda que heliófila, podendo ocupar a borda da floresta).

Esse estudo foi desenvolvido com o intuito de inferir a história filogeográfica de *Kentropyx calcarata* na Amazônia oriental e investigar os principais fatores e processos evolutivos envolvidos. Nós buscamos verificar se os maiores rios amazônicos (Amazonas, Tocantins, Xingu, Tapajós, Jari e Trombetas) separam populações dessa espécie, avaliando, caso positivo, se formam barreiras primárias ou secundárias e como se dá a relação entre essas populações. Além disso, investigamos a dinâmica demográfica das populações a fim de detectar indícios de eventos de gargalo de garrafa ou expansão populacional que pudessem estar associados às oscilações climáticas do Pleistoceno. Por fim, analisamos se é possível detectar variação genética em populações de *K. calcarata* simpátricas com *K. altamazonica*, que pudessem ser correlacionadas às divergências morfológicas observadas por Gallagher *et al.* (1986).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem e obtenção de dados moleculares

O estudo foi realizado com base nos genes mitocondriais Citocromo b (Cytb) e 16S, e nos genes nucleares DNAH3 (*dynein, axonemal, heavy chain 3*) e SINCAIP (*synuclein, alpha interacting protein*). Amostras de tecido (cauda, músculo ou fígado) de 260 espécimes de *K. calcarata* procedentes de várias localidades da Amazônia (Anexo), depositados na coleção de herpetologia Osvaldo Rodrigues da Cunha do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), foram utilizadas. Das sequências referentes aos genes mitocondriais, 67 já estavam previamente disponíveis no *Genbank*, provenientes do trabalho de Avila-Pires *et al.* (2012). Como grupo externo, foram adotadas as espécies *Kentropyx striata* (Daudin 1802), *Kentropyx pelviceps* (Cope 1868) e *Kentropyx altamazonica* (Cope 1876), cada uma representada por quatro espécimes.

O DNA genômico foi extraído utilizando o método do fenol-clorofórmio, seguindo o protocolo proposto por Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. Em amostras com pouca quantidade de tecido a extração do DNA foi realizada através de kit de extração *DNAeasy Blood & Tissue* (QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante. Para a amplificação do material genético via PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram utilizados os mesmos *primers* de marcadores mitocondriais utilizados por Avila-Pires *et al.* (2012). Adaptaram-se os programas de PCR (Tabela 1) para os quatro genes e todos os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do MPEG.

Marcadores	Primers	Perfil da reação de PCR: desnaturação/anelamento/extensão	Fonte
mtDNA			
16S		94°C (2:45)/ 94°C (0:15), 50°C	Dolumbi et al
	16SL (5'-CGCCTGTTTATCAAA AACAT-3')	(1:00), 72°C (1:00) × 35/72°C (7:00),	1991
~ -	16SH (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')	4°C (∞)	~
Cytb	IgCytb_F2 (5'-CCACCGTTGTTATTCAACTAC-3')	94°C (2:45)/ 94°C (0:15), 50°C (1:00), 72°C (1:00) × 35 (-	Corl <i>et al.</i> , 2010
	CB3-H (5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3')	0.3°C/ciclo)/ 72°C (7:00), 4°C (∞)	Palumbi <i>et al.</i> , 1991
nuDNA			
DNAH3		94°C (5:00)/94°C (0:30), 65.4°C	Townsond at
	F1(5'- GGTAAAATGATAGAAGAYTACTG-3')	(0:30), 72°C (1:00) \times 35/ 72°C (5:00),	
	R6(5'-CTKGAGTTRGAHACAATKATGCCAT-3')	8°C (∞)	<i>al.</i> , 2008
SINCAIP			
	F10(5'-CGCCAGYTGYTGGGRAARGAWAT-3')	94°C (5:00)/ 94°C (0:30), 51°C	Townsend et
	R13(5'-GGWGAYTTGAGDGCACTCTTRGGRCT-	$(0:30), 72^{\circ}C(1:00) \times 35/72^{\circ}C(5:00),$	al., 2008
	3')	8°C (∞)	,

Tabela 1 – Parâmetros da PCR e *primers* utilizados no estudo.

Após a amplificação e visualização da qualidade dos produtos da PCR (via eletroforese em gel de agarose a 1%), estes foram purificados utilizando o método de Polietileno-Glicol (PEG 8000), e posteriormente submetidos aos procedimentos de sequenciamento, utilizando o *Big Dye Terminator kit* (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut), de acordo com as especificações do fabricante. As sequências foram obtidas nos sentidos direto (*forward*) e inverso (*reverse*) para cada amostra e posteriormente editadas e alinhadas no programa BioEdit v. 7 (Hall, 1999), utilizando do algoritmo CLUSTAW. Para o gene 16S também foi utilizado o algoritmo *Multiple Alignment using Fast Fourrier Transform* (MAFFT) v.7 (Katoh & Standley, 2013) para assegurar os reais *loci* dos *gaps*.

Algumas das amostras do *Genbank* para os quais somente estavam disponíveis os genes mitocondriais, e para os quais obtivemos alíquotas de tecidos na coleção do MPEG, foram extraídas novamente para amplificação dos marcadores nucleares. Ao total, obtivemos 260 sequências para o marcador mitocondrial Cytb e 248 para 16S, além de 214 amostras para o gene nuclear DNAH3 e 183 para SINCAIP.

Devido à presença de sítios heterozigotos, utilizamos o programa PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003) para identificar a fase dos alelos. Para assegurar a inexistência de pseudogenes, as sequências do gene Cytb (único gene codificante nesse

estudo) foram traduzidas para aminoácidos com o auxílio do programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), de forma a garantir a ausência de códons de parada (*stop codons*). O mesmo programa foi utilizado para calcular a composição das bases, as taxas de transição e transversão e a porcentagem de sítios invariáveis e informativos. A saturação das bases foi verificada através do programa Dambe v. 4.2.13 (Xia & Xie, 2001), onde foram plotados os números de transições e transversões *versus* a divergência nucleotídica sob o modelo Tamura-Nei (1984).

2.2 Inferências filogenéticas

As análises filogeográficas foram realizadas utilizando um banco de dados concatenados no programa Sequence Matrix (Meier *et al.*, 2006), contendo 272 espécimes (260 do grupo interno e 12 do grupo externo), incluindo os quatro marcadores. As amostras não sequenciadas para determinados genes foram preenchidas como *missing data* pelo programa. Foram realizadas análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB).

A análise de MV foi obtida com o auxílio do programa RAxML-HPC2 *on* XSEDE, disponível no site Portal Cipres (https://www.phylo.org/-; Miller & Schwartz, 2010) e RAxML V8 (Stamatakis, 2014). A melhor árvore de MV foi obtida a partir de uma busca heurística dentre 100 árvores e o suporte dos ramos com 1000 réplicas de *bootstrap (bs)*. Para a árvore de MV, foram considerados bem suportados os ramos cujos valores de *bs* foram iguais ou superaram 70%, seguindo a sugestão de Hillis & Bull (1993).

Para as análises de IB, buscou-se a melhor estratégia de partição para o conjunto de dados através do programa Partition Finder (Lanfear *et al.*, 2012). Além disso, foi realizada uma busca pelo modelo evolutivo mais apropriado para explicar a variação das sequências gênicas através do programa JModeltest 0.1.1 (Posada *et al.*, 2003), sob o Critério de Informação Bayesiana (BIC). Uma árvore bayesiana foi inferida a partir do programa MrBayes versão 3.1

(Ronquist & Huelsenbeck, 2003), com duas corridas independentes de quatro cadeias Markovianas com 10 milhões de gerações e amostragem de árvores a cada 1000 gerações.

A convergência dos parâmetros amostrais foi avaliada por meio da estacionariedade da cadeia de Markov usando o programa Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007). O mesmo programa foi utilizado para assegurar que a amostragem da distribuição posterior tenha alcançado o tamanho efetivo mínimo suficiente (ESS>200) para garantir a estimativa significativa dos parâmetros. As árvores que foram amostradas antes da estabilidade dos valores de *log-likelihood* na cadeia de Markov foram descartadas (25% das árvores obtidas), conforme as recomendações de Huelsenbeck & Hall (2001). As amostras restantes após o *burn-in* foram utilizadas para estimar os valores de probabilidade posterior (*pp*), comprimento dos ramos e topologia da árvore. Foram considerados significativos apenas os valores de *pp* maiores ou iguais a 90%.

2.3 Análises populacionais

As populações foram definidas com base nos ramos bem apoiados resultantes das árvores de MV e IB e nos resultados obtidos por análises de agrupamento Bayesiano inferidas com o software *Structure* v. 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). O software Haploviewer v4.1 auxiliou na construção de redes de haplótipos (Barrett *et al.*, 2005), determinando o número de haplótipos únicos e a distribuição dos haplótipos compartilhados com base em cálculos de verossimilhança.

O arquivo de entrada para o *Structure* v. 2.3.1 foi obtido através do *software Xmfa2struct* (http://www.Xavierdidelot.xtreemhost.com/clonalframe.htm), o qual traduziu uma matriz combinada das sequências dos quatro marcadores (260 amostras) para o formato *Xtended Multi Fasta Aligment* (XMFA) e gerou um mapa de distância entre os *loci*. A matriz foi construída a partir de três blocos, sendo um composto pelos genes mitocondriais

concatenados (Cytb e 16S), por possuírem herança comum e ligada, e os outros dois pelos marcadores nucleares DNAH3 e SINCAIP.

No programa *Structure* v. 2.3.1 foram adotadas quatro corridas markovianas para cada um dos valores dos clusters populacionais (K), que variaram de 1 a 15, com gerações e *burnin de* 10.000, seguindo o modelo *admixture* implementado no software. O melhor valor de K foi obtido pelo método de Δ K de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), executado no site *Structure Harvester* (http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/#). As corridas referentes ao valor escolhido de K foram combinadas no software CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007).

A matriz de distância genética foi calculada entre e dentro dos grupos definidos pelas inferências filogenéticas com o auxílio do programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) sob a forma corrigida, utilizando o modelo Tamura-Nei, e não corrigida (distância-p). Para avaliar o nível de influência da distância geográfica na diversidade genética, as distâncias genéticas e geográficas foram comparadas par-a-par entre os indivíduos, através do teste de Mantel, com o auxílio do programa Alleles in Space (Miller, 2005), com 1000 randomizações.

A fim de testar a ocorrência de expansão populacional na história demográfica de *K. calcarata* foram calculados, para cada população estabelecida pelas árvores filogenéticas e pelo software *Structure*, o grau de diversificação genética, por meio da análise de variância molecular (AMOVA); os padrões de diversidade estatística (número de sítios polimórficos, número de haplótipos, diversidade haplotípica e nucleotídica); os índices de fixação (*Fst*) de cada grupo; e os valores dos testes D de Tajima (Tajima, 1996) e Fs de Fu (Fu, 1996) (com 1000 permutações). A variância molecular (AMOVA) dos genes mitocondriais concatenados, calculada entre e dentro dos agrupamentos obtidos a partir das análises filogeográficas, foi comparada entre os marcadores e com os grupos formados a partir das áreas geográficas limitadas pelos rios amazônicos (interflúvios). Essas e as demais análises supracitadas foram

feitas com o auxílio do programa Arlequim 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). A partir desse mesmo programa obteve-se uma matriz de *Fst* para avaliar a estrutura das populações genéticas.

Para analisar se existe variação gênica entre populações de *K. calcarata* em simpatria com *K. altamazonica*, com relação às demais, foram calculados os níveis de divergência nos grupos populacionais das regiões próximas às margens do rio Xingu (Usina Hidrelétrica de Belo Monte), Amazonas (Trombetas, Oriximiná, Urucará) e nas proximidades do rio Madeira (Rondônia), onde *K. altamazonica* pode ocorrer (Gallagher *et* al., 1986; Avila-Pires, 1995). Para tanto, a partir dos resultados das análises filogenéticas, foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa Arlequim 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) para calcular o grau de variabilidade genética entre as populações simpátricas (caso se agrupem) e as demais populações de *K. calcarata*.

Métricas populacionais de polimorfismo de DNA e testes de neutralidade foram calculados para o mtDNA considerando as regiões geográficas delimitadas pelos rios amazônicos (Amazonas, Trombetas, Jari, Tocantins, Xingu e Tapajós), a fim de analisá-los como potenciais barreiras. Foram definidas oito regiões geográficas: oeste do rio Trombetas, interflúvio Trombetas–Jari, leste do rio Jari, ilha do Marajó, leste do rio Tocantins e interflúvios, Xingu–Tocantins, Tapajós–Xingu e Madeira–Tapajós.

2.4 Tempos de divergência e dinâmica demográfica

Para estimar os tempos de divergência entre as principais linhagens de *K. calcarata* e relacioná-los aos eventos propostos pelas hipóteses de diversificação, foi estimada uma árvore de espécies com as populações estabelecidas a partir das inferências filogenéticas, através do programa BEAST v. 1.6.0 (Drummond & Rambaut, 2007). A taxa de substituição amplamente utilizada em répteis Squamata, de 0,65% de alterações de linhagem por milhões de anos para marcadores mitocondriais, estimado por Macey *et al.* (1998), foi utilizada para calibração do relógio. O *prior* e o modelo de relógio molecular utilizados foram *Yule Process*

e o modelo relaxado (*log* normal não correlacionado), respectivamente, o qual acomoda a possibilidade de taxas independentes de evolução molecular nos diferentes ramos (Drummond *et al.*, 2007). As análises foram executadas com duas corridas independentes, por 100 milhões de gerações, amostrando-se uma árvore a cada 10.000 gerações. Nessa análise os modelos evolutivos de substituição de cada gene foram estabelecidos separadamente, buscados previamente no programa JModeltest 0.1.1 (Posada *et al.*, 2003).

O programa Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007) foi utilizado para visualizar a estacionariedade e verificar a convergência das corridas independentes, onde foram visualizados os *scores* de *log-likelihood* plotados contra o número de gerações. As médias das idades dos nós foram calculadas através de uma estimativa de *burn-in* de 2500 gerações estimadas por esse mesmo programa. As árvores foram sumarizadas em uma árvore de clado máximo de credibilidade (MCC) após burnin de 10% utilizando o programa Tree Annotator, incluído no pacote do Beast.

A história demográfica de cada agrupamento populacional foi investigada a partir do método coalescente multilocus *Extended Bayesian Skiline Plots* (EBSP), o qual incorpora diferenças estocásticas na genealogia dos genes, estimando mudanças no tamanho da população através do tempo (Drummond *et al.*, 2005; Heled & Drumond, 2008). A taxa de mutação utilizada foi a mesma utilizada para a calibração do relógio molecular (Macey *et al.*,1998). Foram considerados os modelos de substituição de cada gene separadamente e o modelo de relógio utilizado foi o relógio relaxado. O número de gerações necessário para a convergência dos parâmetros amostrais foi de 100 milhões de gerações, com amostragem de árvores a cada 10.000 gerações. Os gráficos foram gerados pelo programa R (http://www.R-project.org/).

Foi investigada a *distribuição mismatch* de cada uma das populações, comparando a distribuição observada com a curva unimodal obtida a partir de um modelo de expansão

populacional recente. Os gráficos da *distribuição mismatch* foram gerados no programa DNASP DnaSP v.5 (Rozas & Rozas, 1999). Os índices de *Raggedness*, com seus respectivos valores estatísticos, foram calculados para cada agrupamento através do programa Arlequim 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

3 RESULTADOS

3.1 Composição e saturação do banco de dados

O banco de dados resultante (260 sequências) concatenando os quatro genes (16S, Cytb, DNAH3 e SINCAIP) incluiu 2547 pares de bases. A análise gráfica das transições e transversões *versus* a divergência nucleotídica, calculada para cada marcador, indicou não haver saturação no banco de dados (Figura 6).



Figura 6 – Gráficos das transições e transversões (eixo y) em função da diversidade nucleotídica (eixo x), calculada sob o modelo Tamura-Nei (1984) para cada marcador utilizado no estudo: A = 16S; B = Cytb; C = DNAH3; D = SINCAIP. As transições são representadas pelas linhas de coloração azul e a transversões pelas linhas de cor verde.

Quanto à variabilidade dos marcadores, o gene Cytb apresentou maior quantidade de sítios variáveis e informativos e os marcadores nucleares mostraram-se, em geral, menos variáveis em relação aos mitocondriais. Um panorama geral da variabilidade dos marcadores é exibido na Tabela 2.

Tabela 2 – Panorama geral dos dados genéticos. Mt = DNA mitocondrial; Nu = DNA nuclear; Si = número de sítios variáveis; Pb = quantidade de pares de base; N = número de amostras amplificadas; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; $\pi =$ diversidade nucleotídica; k = proporção de sítios polimórficos; S = número de sítios segregantes.

GENE	DNA	Si/Pb	Ν	h	Hd	π%	k	S
Cytb	Mt	187/782	260	153	0.986	2.96%	21.32	152
16 S	Mt	56/526	248	78	0.799	0.66%	3.32	42
DNAH3	Nu	15/734	214	73	0.055	0.01%	0.056	6
SINCAIP	Nu	7/505	183	38	0.743	0.65%	3.263	32

3.2 Inferências filogenéticas

Os resultados mostraram que a melhor estratégia de partição encontrada para o banco de dados concatenado foi obtida por gene. Os modelos evolutivos mais adequados sob o critério BIC foram TIM2+G para o gene 16S, HKY+I+G para Cytb, K80+I para DNAH3 e HKY para SINCAIP. As árvores filogenéticas resultantes das análises de Inferência Bayesiana (IB) e de Máxima Verossimilhança (MV) apresentaram os mesmos agrupamentos filogenéticos (Figura 7b).

A monofilia de *Kentropyx calcarata*, assim como de todo o grupo *calcarata*, é fortemente suportada (pp/bs = 1.0/98 para *K. calcarata* e pp/bs = 1.0/100 para o grupo *calcarata*), porém a relação entre as principais linhagens filogeográficas de *K. calcarata* e dessa espécie com o grupo externo (*K. pelviceps* e *K. altamazonica*), obteve baixo apoio estatístico (Figura 7b).



Figura 7 – A) Distribuição geográfica das amostras utilizadas neste trabalho. A área amostrada condiz ao campo destacado no mapa da América do Sul. Os pontos representam as localidades amostradas e as cores dos círculos correspondem à coloração atribuída a cada população, de acordo com a legenda do mapa. A linha preta (entre o grupo F e G no Barplot) corresponde à amostra MPEG 29306 que não foi agrupado com nenhuma outra (indivíduo isolado). Grupos externos correspondem a: *Kentropyx striata* (Ks), *K. altamazonica* (Ka) e *K. pelviceps* (Kp). B) Árvore resultante das análises filogenéticas. Os valores de probabilidades posteriores (*pp*) estão representados acima dos valores de bootstrap (*bs*); *pp*<0.5 e *bs*<30 não estão indicados. Cada agrupamento populacional (*pp* = 1.0 ou *bs* \geq 70%) está representado por colorações distintas, associadas ao resultado do *Barplot* gerado pela análise do *Structure* (representada na figura pela coluna à direita).

A análise efetuada no programa *Structure* estimou, a partir dos cálculos de ΔK de Evanno, maior valor de probabilidade para K = 10 (quando K = 10, ΔK atingiu maior pico de probabilidade). Cada população estimada pelo *Structure* está representada por uma coloração distinta no *Barplot* (Figura 7b), exceto pelas populações azuis (E e F) as quais foram agrupadas no *Structure*, mas consideradas como sendo duas populações distintas por estarem situadas em grupos estatisticamente bem suportados pelos apoios de *pp* e separados geograficamente (respectivamente ao norte e ao sul do Rio Amazonas, salvo exceções; Tabela 3). As cores atribuídas aos agrupamentos resultantes da árvore filogenética são equivalente à coloração dos pontos plotados no mapa (Figura 7a). As regiões geográficas e suas respectivas localidades referentes a cada grupo filogenético estão representadas na tabela 3.

Grupos	Interflúvio/Região geográfica	Localidades
A (branco)	Trombetas–Jari	Almeirim (Reserva biológica Maicuru, Monte Dourado, floresta estadual do Paru)
B (lilás)	Leste do rio Jari	Laranjal do Jari
С	Oeste do rio Trombetas	Urucará-AM, Oriximiná-AM
(amarelo)	Trombetas–Jari	Floresta estadual de Trombetas
	Xingu–Tocantins	Caxiuanã
D	Ilha do Marajó	Marajó
(laranja)	Leste do rio Tocantins Araguaia–	Diversas localidades na região leste do rio Tocantins
	Tocantins	Usina hidrelétrica de Estreito
E	Trombetas–Jari	Almeirim (floresta estadual do Paru)
(azul claro)	Leste do rio Jari	Amapá
F	Trombetas–Jari	Almeirim (floresta estadual do Paru),
(azul escuro)	Xingu–Tocantins	Regiões entre os rios Xingu e Tocantins, leste e oeste do rio
	Tapajós–Xingu	Anapu
		Usina hidrelétrica de Belo Monte
G	Madeira–Tapajós	Resex Tapajós-Arapiuns, Juruti-AM, Itaituba
(vermelho)		
Н	Madeira–Tapajós	Itaituba e Rondônia
(verde)		
Ι	Madeira–Tapajós	Maués-AM
(rosa)		
J	Tapajós–Xingu	Regiões entre os rios Tapajós e Xingu
(marrom)	Xingu–Tocantins	Usina hidrelétrica de Belo Monte
Ind. Isolado (preto)	Oeste do rio Trombetas	Itacoatiara-AM

Tabela 3 – Regiões geográficas/localidades referentes a cada grupo filogenético (incluindo o indivíduo isolado) obtidos a partir das árvores de IB e MV.

Os limites geográficos da maioria das populações coincidem em boa parte com os principais rios da bacia amazônica (Figura 7). O rio Amazonas limita os grupos A, B e E ao

norte e D, G, H, I, J ao sul, embora os grupos C e F ocorram em ambas as margens (Figura 7). Ao norte do rio Amazonas o rio Jari parece separar os grupos A e B, enquanto o grupo E ocorre nos dois lados desse rio. Ao sul do rio Amazonas os grupos G, H e I estão restritos ao interflúvio Madeira–Tapajós; os grupos J e F restringem-se em grande parte ao interflúvio Tapajós–Xingu e Xingu–Tocantins/Araguaia, respectivamente; e o grupo D ocupa a ilha do Marajó e leste do baixo rio Tocantins com algumas amostras ocorrendo no Araguaia– Tocantins.

De acordo com a árvore filogenética, o grupo J seria o primeiro a divergir dentro de *K*. *calcarata*, sendo a linhagem irmã de todas as demais. A maioria dos nós basais são suportados apenas pelos valores de *pp*, como o agrupamento entre G e os grupos situados a leste e oeste do rio Tocantins e norte do Amazonas (A, B, C, D, E, F, isolado), os quais também foram agrupados com *pp*>90%; o agrupamento entre o indivíduo da localidade Itacoatiara-AM (isolado) e os grupos de A a F; e a relação entre os grupos D, E e F.

3.3 Inferências populacionais

As redes de haplótipos dos marcadores mitocondriais exibem haplogrupos concordantes com os agrupamentos formados pelas inferências filogenéticas, enquanto que as redes de haplótipos dos nucleares não apresentam estruturação geográfica evidente entre as populações (Figura 8). Os grupos da rede de haplótipos de Cytb estão separados por uma maior quantidade de passos mutacionais do que os demais genes (Figura 8).

As redes de haplótipos dos marcadores nucleares foram construídas com base nas duas fases dos alelos. Para esses genes (nucleares) não foram obtidas sequências da população B que, portanto, não está representada nas respectivas redes de haplótipos. Não foi observado compartilhamento de haplótipos entre os grupos em Cytb. Nos demais genes, mais conservados, houve compartilhamento de haplótipos entre alguns grupos, sendo mais frequente na rede de haplótipos dos marcadores nucleares (Figura 8). Na rede de 16S, o grupo

A compartilhou haplótipos com B e F. Este último, por sua vez, também compartilhou haplótipos com os grupos C, E e J.



Figura 8 – Redes de haplótipos construídas para os quatro marcadores utilizados no estudo: (A) Cytb; (B) 16S; (C) DNAH3; (D) SINCAIP. As cores correspondem à coloração dos grupos expostos na figura 7. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos de cada haplótipo. Os pontos intermediários (círculos menores) referem-se ao número de passos mutacionais entre as populações. Para facilitar a visualização foi indicado, em alguns segmentos, o número total de mutações.

O teste de Mantel, calculado a partir do banco de dados dos marcadores mitocondriais concatenados, não detectou correlação significativa (p>0.05) entre as distâncias geográficas e genéticas (Figura 9). A matriz de distância genética revela maior variabilidade entre os clados do que dentro deles. Tanto para a matriz de distância-p não corrigida quanto para a corrigida

pelo modelo de Tamura-Nei, as maiores diferenças genéticas foram encontradas entre o grupo G e as demais populações, principalmente comparado com os grupos B, D e E (Tabela 4).

Os valores apresentados na matriz de distância corrigida pelo modelo de Tamura-Nei variaram de 0.015, quando foram comparados os grupos A e B, até 0.050, obtido ao comparar o grupo G com os grupos B e D. Na matriz de distância-p não corrigida esse valores variaram de 0.015 a 0.048 entre os mesmos grupos. As menores diferenças foram detectadas quando se comparou o grupo F com o grupo E e A, e este último com o grupo B.



Figura 9 – Correlação entre a distância genética no eixo Y e a distância geográfica no eixo X. Não há evidências de alguma relação estatística significativa (p>0.05).

Tabela 4 – Matriz de distância genética (distância-p) par-a-par calculada para os grupos filogenéticos. Os números em negrito e os plotados na diagonal inferior representam os valores médios calculados da distância genética corrigida pelo modelo Tamura-Nei, dentro e entre os grupos, respectivamente. Os valores da diagonal superior correspondem à distância-p não corrigida calculada entre os grupos.

	Α	В	С	D	Ε	F	G	Н	Ι	J
A	0.004	0.015	0.025	0.028	0.027	0.016	0.044	0.042	0.039	0.043
В	0.015	0.007	0.026	0.031	0.030	0.019	0.048	0.045	0.039	0.047
С	0.025	0.027	0.004	0.029	0.029	0.023	0.043	0.043	0.040	0.042
D	0.029	0.032	0.030	0.003	0.027	0.020	0.048	0.044	0.040	0.041
Е	0.028	0.031	0.030	0.028	0.006	0.019	0.045	0.044	0.041	0.045
F	0.017	0.020	0.023	0.021	0.019	0.003	0.039	0.033	0.031	0.034
G	0.047	0.050	0.045	0.050	0.048	0.040	0.004	0.036	0.044	0.045
н	0.044	0.048	0.045	0.047	0.046	0.035	0.038	0.001	0.025	0.036
Ι	0.040	0.041	0.042	0.042	0.043	0.032	0.046	0.026	0.000	0.029
J	0.045	0.049	0.045	0.043	0.047	0.036	0.047	0.037	0.030	0.009

Para os marcadores mitocondriais, a variância molecular mostrou-se maior entre os grupos filogenéticos do que entre os indivíduos dentro dos grupos. Ao contrário, para os marcadores nucleares houve maior variação dentro dos grupos do que entre eles. O valor do índice de fixação (Fst) foi superior para os genes mitocondriais concatenados, nas populações definidas pelas análises filogeográficas (0.85168) (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA), comparando as diferentes variações entre e dentro dos grupos filogeográficos. Os cálculos obtidos com base nos marcadores mitocondriais concatenados foram realizados entre os grupos filogenéticos e geográficos. A AMOVA calculada utilizando os marcadores nucleares separadamente foi calculada para os grupos filogenéticos. gl = grau de liberdade; Var.comp = Variação dos componentes; **%Var** = percentual de variação; **Fst**: Índice de fixação total dos grupos.

Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos
Grupos Filogenéticos		
mtDNA (Fst = 0.85168)		
gl	10	249
Var. comp.	15,11753 Va	2,63278 Vb
% variação	85,17%	14,83%
DNAH3 (Fst = 0.24313)		
gl	9	336
Var. comp.	0.51104 Va	1.59086 Vb
% variação	24.31%	75.69%
SINCAIP (Fst = 0.07732)		
gl	9	334
Var. comp.	0.14014 Va	1.67236 Vb
% variação	7.73%	92.27%
Grupos geográficos		
mtDNA (Fst = 0.62814)		
gl	7	252
Var. comp.	11,1016 Va	6,57143 Vb
% variação	62,81%	37,19%

Os cálculos dos parâmetros populacionais genéticos restringiram-se aos marcadores mitocondriais concatenados, uma vez que os nucleares apresentaram baixa variabilidade entre as populações, bem como por não possuírem amostras suficientes para representar todos os grupos. Além dos agrupamentos populacionais resultantes da árvore filogenética (MV e IB), as métricas foram calculadas para os agrupamentos geográficos, limitados pelos principais rios da bacia amazônica (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros genéticos calculados para cada grupo populacional e para as regiões geográficas limitadas pelos rios da bacia amazônica. $\mathbf{n} = n$ úmero de indivíduos; $\mathbf{S} = n$ úmero de sítios segregantes; $\mathbf{h} = n$ úmero de haplótipos; $\mathbf{Hd} \pm \mathbf{SD} =$ diversidade haplotípica \pm desvio padrão; $\pi \pm \mathbf{SD} =$ diversidade nucleotídica \pm desvio padrão; $\mathbf{k} = n$ úmero de sítios polimórficos; \mathbf{D} de Tajima e FS de Fu = Testes de desvio de neutralidade; Os números em negrito representam os valores estatísticos significantes (p< 0.05 para D de Tajima e p ≤ 0.02 para FS de Fu); Fst = Índice de fixação. Regiões geográficas/ Interflúvios: Marajo = Ilha do Marajó; E.rioToc = Leste do rio Tocantins; Xing-Toc = Interflúvio Xingu-Tocantins; Tap-Xing = Interflúvio Tapajós-Xingu; Mad-Tap = interflúvio Madeira-Tapajós; E.rioJari = Leste do rio Jari; Tromb-Jari = Interflúvio Trombetas-Jari; W.rioTromb = Oeste do rio Trombetas;

Grupos filogenéticos	n	S	h	$Hd \pm SD$	$\pi \pm SD$	k	D de Tajima	FS de Fu	Fst
Α	62	29	21	0.895 ± 0.029	0.00388 ± 0.00034	3.00635	-1.65149	-17.2995	0.85364
В	3	9	3	1.000 ± 0.272	0.00462 ± 0.00130	6.00000	0.00000	0.58779	0.85225
С	34	25	15	0.865 ± 0.051	0.00491 ± 0.00067	3.75045	-1.29572	-17.9612	0.85196
D	28	42	19	0.950 ± 0.030	0.00349 ± 0.00050	4.50265	-2.09262	-19.4033	0.84901
Ε	23	29	17	0.964 ± 0.026	0.00538 ± 0.00039	6.94071	-0.37746	-4.80315	0.85189
F	33	24	20	0.958 ± 0.018	0.00369 ± 0.00038	2.74621	-2.0163	-25.2467	0.85130
G	31	27	19	0.946 ± 0.025	0.00379 ± 0.00034	4.86882	-0.82389	-14.7977	0.85504
н	6	6	3	0.733 ± 0.155	0.00231 ± 0.00065	3.00000	0.81086	0.23500	0.85834
I	3	0	1	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.84661
J	36	30	16	0.897 ± 0.031	0.00918 ± 0.00058	7.03333	0.09953	-4.59406	0.85834
Regiões geográ	ficas/I	nterflú	ívios						
Marajo	12	15	7	0.879 ± 0.075	0.00242 ± 0.00060	3.12121	-1.59556	-3.86296	0.63769
E.rioToc	13	23	12	0.987 ± 0.028	0.00348 ± 0.00041	4.51282	-1.68930	-6.81728	0.63631
Xing-Toc	55	76	29	0.939 ± 0.022	0.01763 ± 0.00122	13.4511	-0.65094	-20.8644	0.62506
Tap-Xing	38	52	17	0.912 ± 0.028	0.01342 ± 0.00249	10.2162	-0.51359	-3.29944	0.62704
Mad-Tap	40	69	23	0.959 ± 0.016	0.01255 ± 0.00194	16.1000	-0.02561	-5.27739	0.62406
E.rioJari	22	55	17	0.965 ± 0.028	0.01042 ± 0.00241	13.4458	-0.31734	-2.19288	0.62760
Tromb-Jari	76	66	32	0.929 ± 0.021	0.01113 ± 0.00154	8.35684	-1.16253	-9.92302	0.63050
W.rioTromb	4	46	4	1.000 ± 0.177	0.01810 ± 0.00610	23.333	-0.72843	1.30358	0.62438

Os maiores índices de diversidade haplotípica foram observados nos grupos B, (Laranjal do Jari), D (ilha do Marajó/Leste do rio Tocantins), E (Paru/Amapá) e F (Paru/Xingu–Tocantins), e a maior diversidade nucleotídica no Grupo J (Tapajós–Xingu). Dentre os agrupamentos por área geográfica, os maiores índices de diversidade haplotípica foram encontrados a leste do rio Tocantins e oeste do rio Trombetas. Esta última também apresentou o maior índice de diversidade nucleotídica em relação às outras regiões geográficas, seguido do agrupamento correspondente ao interflúvio Xingu–Tocantins. A diversidade haplotípica foi relativamente alta em todos os grupos (moleculares e geográficos).

A diversidade nucleotídica foi maior, na maioria dos casos, nos grupos geográficos que nos moleculares, exceto pelas localidades da Ilha do Marajó e a leste dos rios Tocantins-Araguaia.

Os cálculos de desvio de neutralidade foram significativos nos grupos A, D e F para ambos os testes (D de Tajima e Fs de Fu), enquanto que os grupos C e G apresentaram valores estatísticos significativos apenas para o teste Fs de Fu. Todos os valores significativos resultantes dos testes de desvio de neutralidade foram negativos, indicando expansão populacional para esses grupos.

A matriz dos índices de fixação (Fst) resultantes da comparação par-a-par entre os 10 grupos filogenéticos obteve todos os valores significativos ($p\leq0.05$), com exceção do resultado da comparação entre os grupos I e B. Os maiores índices foram alcançados quando se comparou a população A, da calha norte do rio Amazonas, com os grupos G, H e I, do interflúvio Madeira–Tapajós, e o grupo H (Rondônia/Itaituba) com B, a leste do rio Jari, e com I (Maués-AM). O menor valor de Fst obteve-se ao comparar os grupos E (Paru/Amapá) e F (Paru/Xingu–Tocantins) (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores do índice de fixação (Fst) calculados par-a-par entre os grupos filogenéticos. O número em negrito representa o único valor estatístico não significante (p > 0.05).

	Α	В	С	D	Ε	F	G	Н	Ι	J
A	*									
B	0.80055	*								
С	0.85860	0.82921	*							
D	0.88134	0.85584	0.83093	*						
Ε	0.85588	0.80146	0.79257	0.75713	*					
F	0.83207	0.81690	0.79500	0.74780	0.67847	*				
G	0.91179	0.88961	0.86924	0.88343	0.85215	0.85770	*			
Н	0.92750	0.92396	0.89107	0.89586	0.85431	0.86973	0.85583	*		
Ι	0.92708	0.94118	0.89394	0.89266	0.85371	0.87711	0.88318	0.92070	*	
J	0.88790	0.83323	0.84490	0.83803	0.82943	0.82517	0.83873	0.79299	0.78435	*

3.4 Tempos de divergência

O cronograma apresentou uma topologia em parte concordante com a obtida nas análises de IB e MV (Figura 10). Foi recuperado, com valores medianos de probabilidade posterior, o clado que envolve os grupos A, B e E, restritos ao norte do Amazonas; C e F, presentes também no interflúvio Xingu–Tocantins; e o grupo D, presente na ilha do Marajó e a leste dos rios Tocantins-Araguaia. As relações dentro desse clado, contudo, foram discordantes entre as duas inferências. A relação irmã entre H e I, presentes no interflúvio Madeira–Tapajós, nas localidades de Rondônia/Pará (Itaituba) e Amazonas (Maués), respectivamente, também foi observada.



Figura 100 – Cronograma com a estimativa de tempos de divergência de *Kentropyx calcarata*. Os clados correspondem às populações definidas pelas análises filogeográficas e de estrutura populacional. Números nos nós correspondem aos valores de probabilidade posterior (*pp*) que apoiam os clados. Os intervalos de confiança das estimativas de tempo, dispostas na escala abaixo da árvore, são representados pelas barras e detalhados na Tabela 8. As cores de cada grupo correspondem às da figura 7. O círculo preto representa o indivíduo isolado, também presente na árvore filogenética da figura 7, representado da mesma forma. Grupos externos correspondem a: *Kentropyx striata* (Ks), *K. altamazonica* (Ka) e *K. pelviceps* (Kp).

Eventos de Divergência	Tempo médio de datação dos eventos	Height 95% HPD	<i>pp</i> (%)
K. altamazonica	11.61	16.9 - 6.91	100
K. striata	9.06	12.16 - 6.12	62
K. pelviceps	7.97	10.42 - 4.98	71
[A, B, C, D, E, F, J, Isolado] - [G, H, I]	1.42	1.97 - 0.94	100
[G] - [H,I]	0.89	1.44 - 0.35	93
[H] - [I]	0.53	0.97 - 0.07	77
[Isolado] - [A, B, C, D, E, F, J]	1.16	1.65 - 0.67	55
[J] - [A, B, C, D, E, F]	0.94	1.36 - 0.53	54
[D, E] - [A, B, C, F]	0.70	1.0 - 0.39	80
[D] - [E]	0.33	0.56 - 0.17	100
[C, F] - [A, B]	0.42	0.65 - 0.23	92
[C] - [F]	0.28	0.42 - 0.16	80
[A] - [B]	0.21	0.37 - 0.09	92

Tabela 8 – Datação média estimada e intervalos de confiança dos tempos de divergência dos eventos, de acordo com a árvore de espécies (Figura 10). A quarta coluna representa os valores de probabilidade posterior de cada nó.

Dentre os nós da árvore de espécies que representam a relação entre os grupos de *Kentropyx calcarata (pp*=1), quatro apresentaram valores de probabilidade posterior superiores a 90% (*pp*>0.90) (Tabela 8). A monofilia entre o grupo A (Almeirim) e o grupo B (Laranjal do Jari-AP) obteve um alto apoio estatístico (*pp*=0.92), assim como o clado envolvendo estes grupos junto aos grupos C e F, de localidades ao norte do rio Amazonas (Trombetas e Paru, respectivamente) e também do interflúvio Xingu–Tocantins (*pp*=0.92). A relação entre D e E, da mesma forma, apresentou alto apoio estatístico (*pp*=1); esta relação foi observada também na árvore das inferências filogeográficas, porém com baixo apoio de *pp* e *bs*. O outro valor de *pp* considerado elevado suporta o clado formado pelos grupos G, H e I, que ocupa a parte leste do interflúvio Madeira–Tapajós.

Quanto à escala temporal, *Kentropyx calcarata* divergiu das demais espécies do gênero durante o Mioceno médio a tardio e suas populações diferenciaram-se mais recentemente, no Pleistoceno. A idade estimada do primeiro evento de diversificação dentro de *K. calcaratai* data de 1,42 Ma e corresponde à diferenciação em dois clados: um envolvendo as linhagens situadas a oeste do rio Tapajós (G, H, I) e o outro agrupando as

demais populações a leste desse rio, abrangendo desde o interflúvio Tapajós–Xingu até a porção a leste dos rios Tocantins-Araguaia, a ilha do Marajó e as áreas ao norte do rio Amazonas (Figura 10). Os eventos de divergência das linhagens dentro desses principais clados ocorreram todos entre 1.16 e 0.21 Ma.

3.5 Dinâmica demográfica

Os gráficos de *distribuição mismatch* (Figura 11) obtidos pelo programa DNASP foram construídos a partir dos genes mitocondriais concatenados e para os agrupamentos com mais de três indivíduos. Os valores referentes ao índice de *Raggedness* (R) não foram estatisticamente significativos ($p \ge 0.05$) para os agrupamentos filogeográficos investigados, o que indica que não se pode rejeitar a hipótese nula de expansão populacional (Harpending, 1994). De acordo com os gráficos (Figura 11) os grupos A, D, E, F e G são os que mais se ajustam a um modelo de expansão, ao contrário dos grupos C, H e J, cujas frequências observadas não seguem o padrão unimodal de expansão populacional.



Figura 11 – Gráficos de *distribuição mismatch* para cada grupo com mais de três indivíduos, com base na diferença entre a frequência dos haplótipos. A linha inteira do gráfico representa a frequência esperada sob o modelo de expansão populacional e a tracejada indica a frequência observada. O valor de *R* refere-se ao índice de *Raggedness*.

Os EBSP foram calculados para cada um dos agrupamentos com mais de três indivíduos e indicaram que o grupo que inclui a ilha do Marajó e a maior parte da área a leste do rio Tocantins (Grupo D) apresentou uma expansão rápida e recente, entre 0.3 e 0.4 milhões de anos. A população F, a qual abrange o interflúvio Xingu–Tocantins, com alguns indivíduos ocorrendo ao norte do rio Amazonas na porção oeste do rio Jari (FLOTA Paru), apresentou indícios de um abrupto crescimento populacional, cerca de 0.2 milhões de anos atrás. Nesse mesmo período, aproximadamente, os EBSP indicam uma expansão populacional nos grupos A e G. Na escala temporal recuperada pela análise, não foi detectado crescimento populacional nos demais grupos (C, E, H e J) (Figura 12).



Figura 112 – Análise de *Extended Bayesian Skyline Plots* calculadas para cada um dos grupos resultantes das inferências filogeograficas.

3.6 Análise sobre deslocamento de caracteres

Os agrupamentos dos indivíduos de *K. calcarata* presentes nos locais onde *K. altamazonica* também ocorre não apresentaram níveis de divergência consideráveis em relação aos outros grupos de *K. calcarata*. As análises filogenéticas agruparam os indivíduos de *K. calcarata* que ocorrem em simpatria com *K. altamazonica*, com altos apoios, em populações distintas, como é o caso dos indivíduos provenientes da região próxima à usina hidrelétrica de Belo Monte no rio Xingu, que foram alocadas tanto no grupo F quanto em J.

Ainda, com relação aos grupos resultantes, mesmo agrupando os indivíduos que ocorrem em simpatria com *K. altamazonica* em uma só população, houve a inclusão de amostras de outras regiões onde não é registrada a ocorrência de *K. altamazonica*. Os indivíduos das localidades próximas ao rio Trombetas, no norte da Amazônia, agruparam-se com exemplares do oeste do rio Anapu, na baía de Caxiuanã (grupo C), onde *K. altamazonica* não ocorre. O outro caso ocorreu entre os indivíduos do grupo H, em Rondônia, que agruparam-se com espécimes de Itaituba, onde não há registros de *K. altamazonica*.

4 DISCUSSÃO

Esse estudo representa um aumento substancial no esforço amostral para a espécie *K*. *calcarata*, incluindo uma amostragem geográfica, de indivíduos e marcadores, mais ampla do que qualquer estudo já feito com a espécie. Utilizando abordagens filogenéticas e populacionais, com base em quatro marcadores moleculares, foi investigada a estrutura das populações amazônicas, sua história demográfica, assim como o padrão dos rios tributários da Amazônia oriental como barreiras para a diversificação das linhagens. Os resultados indicaram que algumas populações de *K. calcarata* estão em processo de expansão na Amazônia e que os principais rios afluentes do rio Amazonas limitam o fluxo gênico entre as populações isoladas a cada lado de suas margens. Contudo, o aumento do número de amostras e a inclusão de marcadores nucleares nas análises, em relação a estudos anteriores, não foram suficientes para a obtenção de bons suportes estatísticos nos nós mais basais da árvore filogenética.

Os genes mitocondriais foram determinantes no estabelecimento das relações filogenéticas, por serem mais variáveis. A alta variabilidade desses marcadores foi revelada a partir dos maiores valores das métricas de polimorfismo de DNA e da variância molecular calculada para cada marcador entre os grupos filogenéticos. Devido à elevada taxa mutacional dos marcadores mitocondriais em relação aos nucleares, sua utilização em estudos filogeográficos torna-se uma ferramenta valiosa para determinar processos evolutivos recentes (Frankham *et al.*, 2008; Antonelli, 2010), como é o caso da diversificação intraespecífica dentro de *K. calcarata.* As análises multi-locus, por sua vez, contribuíram para assegurar maior acurácia nas relações entre as populações, com base em métodos de coalescência e na estimativa dos tempos de divergência (Milá *et al.*, 2011; Brito e Edwards, 2009; Knowles & Carstens 2007).

4.1 Inferências filogenéticas e populacionais

Os resultados das análises filogenéticas e populacionais detectaram a presença de pelo menos onze populações dentro de *Kentropyx calcarata*. Assim como os agrupamentos obtidos pelas inferências filogenéticas, as populações delimitadas geograficamente, tendo como limites os rios amazônicos, mostraram uma diferenciação significativa, com elevados valores nos índices de Fst, indicando haver baixo fluxo gênico entre elas (Wright, 1978; Allendorf & Luikart, 2007; Frankham *et al.*, 2008). Além disso, a análise de variância molecular calculada a partir dos marcadores mitocondriais resultou numa variação genética maior entre os grupos geográficos do que entre os indivíduos presentes em cada grupo, podendo indicar os rios como uma barreira potencial ao fluxo gênico dessas populações. No entanto, estimativas diretas de migração com base em análises coalescentes multi-locus são ainda necessárias para inferências mais robustas quanto aos padrões de fluxo gênico entre as principais linhagens de *K. calcarata*.

O padrão de rios como barreiras ao fluxo gênico é suportado na Amazônia oriental para várias espécies de anfíbios (Fouquet *et al.*, 2012a, b), aves (Aleixo, 2004; Ribas *et al.*, 2012; Maldonado-Coelho *et al.*, 2013; Thom e Aleixo, 2015), insetos (Hall e Harvey, 2002) mamíferos (Ayres e Clutton-Brock, 1992; Lynch Alfaro *et al.*, 2014) e répteis (Avila-Pires *et al.*, 2012). Nossos resultados indicam que o rio Amazonas e seus tributários Tapajós, Xingu e Tocantins, da porção sul, limitam populações de *K. calcarata,* ainda que em alguns momentos essa barreira seja rompida. Possíveis dispersões ocasionais foram observadas através do rio Xingu, envolvendo os grupos F e J, em localidades próximas à usina hidrelétrica de Belo Monte; do rio Tocantins para o grupo D, na região de Estreito; e do rio Amazonas para os grupos C e F, os quais além da margem norte, ocorrem na localidade de Caxiuanã ao sul, e, no caso de F, abrangendo outras regiões do interflúvio Xingu–Tocantins (Figura 7).

As árvores filogenéticas baseadas nos marcadores concatenados (MV, IB) mostraram uma estruturação entre os grupos parcialmente congruente com o cenário previsto por Rosseti & Valeriano (2007) para a região do baixo curso dos rios Amazonas e Tocantins, assim como encontrado por Ávila-Pires *et al.*, (2012). A separação entre os grupos D e F e a inclusão em D dos exemplares da Ilha do Marajó e leste do Tocantins corroboram a hipótese da formação recente da Ilha do Marajó, a partir da alteração do curso do rio Tocantins de nor-noroeste para Nordeste e subsequente surgimento do rio Pará. No entanto, os agrupamentos inesperados obtidos em Avila-Pires *et al.* (2012) foram novamente recuperados. Entre esses agrupamentos está o clado ((D-E)F) que combina populações das calhas norte e sul do Amazonas na altura de sua foz; e o clado C, abrigando populações da margem esquerda da Baía de Caxiuanã (rio Anapu), ao sul do rio Amazonas, e da região próxima ao rio Trombetas, ao norte. Com relação à árvore de espécies, nem todos os nós dos ramos recuperados apresentaram altos valores de probabilidade posterior.

Contudo, em ambas as inferências (árvore de genes concatenados e árvore de espécies) a relação entre os agrupamentos é suportada pela baixa distância genética calculada par-a-par. A monofilia entre o grupo A (Almeirim) e o grupo B (Laranjal do Jari-AP), além de bem apoiada em ambas as árvores (pp = 1.0 e bs = 92 para a árvore de MV e IB; pp = 0.92 para a árvore de espécies) é suportada pela menor distância genética (0.015), em relação aos demais grupos. Da mesma forma, o agrupamento de D e E na árvore de espécies é bem suportado (pp= 1.0) e o grupo C apresenta menores valores de distância corrigida e não corrigida quando comparado com o grupo F. Este grupo, por sua vez é mais próximo de A, de acordo com a matriz de distância, e junto com A, B e C formam um clado bem apoiado na árvore de espécies. A relação entre o clado formado pelos grupos G, H e I também foi recuperada pelos resultados da matriz de distância, onde o grupo G apresenta menor distância genética quando comparado com o grupo H e este com I.

4.2 Datação molecular

De acordo com os resultados do relógio molecular relaxado, as datações não foram totalmente concordantes com Werneck *et al.* (2009), os quais estimaram tempos de diversificação relativamente mais antigos (Figura 4). As relações entre *K. calcarata* e os indivíduos do grupo externo não obtiveram apoios altos de *pp* e *bs* e as estimativas temporais entre eles apresentaram esparsos intervalos de confiança (Figura 10). Tais resultados podem ser decorrentes da calibração adotada e da grande diferença quanto ao esforço amostral intraespecífico. Werneck *et al.* (2009) investigavam as relações interespecíficas do gênero *Kentropyx*, tendo utilizado apenas duas amostras de *K. calcarata.* Além disso, o estudo de Werneck *et al.* (2009) utilizou uma calibração secundária para a origem do gênero *Kentropyx*, obtida a partir do estudo de Giugliano *et al* (2007), que empregou calibrações fósseis para estimar os tempos de diversificação para toda a família Teiidae. A taxa de substituição de marcadores mitocondriais de Macey (1998), utilizada nesse estudo para calibrar as estimativas de tempos de divergência, é baseada em eventos recentes segundo Losos (2009) e com isso, foi utilizada principalmente para estimar de forma mais precisa a datação das divergências populacionais.

A árvore de espécies indicou que a divergência de *Kentropyx calcarata* das demais espécies do gênero data do Mioceno médio a tardio, entre 10 e 5 Ma. A relação entre *K. calcarata* e *K. pelviceps* foi recuperada, como em Werneck *et al.*, (2009), apesar de apresentar suporte estatístico moderado (pp = 0.71). Werneck *et al.* (2009), com base em dois espécimes de *K. calcarata*, um da Guiana e outro do Mato Grosso, estimou a diversificação entre as populações como tendo ocorrido no Plio-Pleistoceno, a aproximadamente 3,4 Ma. Nesse estudo, diferentemente, todas as divergências entre os grupos filogenéticos datam do Pleistoceno. Além das diferenças nos métodos de datação utilizados, os diferentes tempos de diversificação inferidos podem ter sido influenciados também pelos diferentes esforços amostrais adotados, sendo que apesar do nosso estudo possuir um esforço amostral muito mais amplo, o mesmo não incluiu amostras de indivíduos do extremo norte da distribuição da espécie.

O primeiro evento de separação dos agrupamentos filogenéticos ocorreu entre 0,94 e 1,97 Ma. O clado formado pelos grupos G, H e I (pp = 0.93), localizados a oeste do rio Tapajós divergiram dos demais (pp = 0.55), localizados ao Norte e sul do rio Amazonas até a margem leste do rio Tapajós, e formaram dois agrupamentos reciprocamente monofiléticos (Figura 10). Tal divergência pode indicar que o rio Tapajós atuou como barreira inicial vicariante (barreira primária), uma vez que o tempo de divergência das linhagens corresponde à datação estimada do estabelecimento do rio, entre 0,8 a 1,3 Ma, segundo Ribas *et al.* (2012). A datação da divergência e a atribuição do rio Tapajós como barreira primária também concordam com os resultados de Lynch Alfaro *et al.* (2014) e Thom e Aleixo (2015), os quais além disso indicam as áreas de endemismo de Rondônia e Inambari (respectivamente a oeste e leste do rio Madeira) como sendo as mais ancestrais.

Os tempos de diversificação estimados para a divergência entre as populações A e B, assim como entre C e F, D e E, foram os mais recentes, entre 0,09 e 0,65 Ma. A divergência entre A e B pode ser explicada pela presença do rio Jari, que poderia atuar como uma barreira entre as populações. Não há estudos, contudo, que datam o surgimento desse rio, para permitir verificar se há congruência temporal entre o surgimento do rio e a separação entre as populações.

Ainda não existe um consenso quanto ao período exato em que o rio Amazonas foi estabelecido (Figueiredo *et al.*, 2009; Hoorn *et al.*, 2010; Latrubesse *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2012). No entanto, diversos autores concordam que pelo menos desde o Plioceno ele atua como uma barreira, limitando populações às margens norte e sul. Com isso, mesmo que seja considerado o modelo de diversificação mais recente (Ribas *et al.*, 2012; Lynch Alfaro, *et al.*,

2014), o tempo de divergência recuperado para a diferenciação entre as populações de *K*. *calcarata* das margens norte e sul do rio Amazonas ainda será mais recente. Portanto, é improvável que o rio tenha sido a barreira inicial (primária) que separou as populações.

Sobre o agrupamento entre os indivíduos próximos ao rio Trombetas e a oeste do rio Anapu, na baía de Caxiuanã (grupo C), Avila-Pires et al. (2012) sugeriu que possa ter sido consequência de rearranjos na calha do rio (de forma que trechos de terra em uma das margens tenha passado para a outra margem), ou uma possível dispersão passiva, entre margens opostas, em bancos de capim flutuante. De acordo com a árvore de espécies, esse grupo mostrou-se mais próximo de F, que também ocorre em ambas as margens da foz do rio Amazonas, e os dois grupos junto aos grupos A e B (norte do rio Amazonas) formam um clado reciprocamente monofilético bem apoiado (pp = 0.92), que divergiu entre 0.23 e 0.65 Ma, após a formação do rio. Da mesma forma, assim como em Avila-Pires et al (2012), os grupos do leste do rio Tocantins/Marajó (D) e Paru/Amapá (E) formaram um agrupamento monofilético (pp = 1.0), irmão do clado supracitado. Maior similaridade entre as espécies junto à foz do rio Amazonas em relação a seu médio curso é algo já observado (Ayres & Clutton-Brock, 1992; Avila-Pires et al., 2012), indicando ter havido, em determinados momentos, migração de fauna entre as margens do rio Amazonas nessa região. O que levou a isso é algo ainda não entendido, talvez relacionado também à dinâmica do rio e/ou a variações no nível do mar (Avila-Pires, 1995).

4.3 História demográfica

Os resultados dos testes D de Tajima, FS de Fu, bem como o padrão unimodal das curvas de *distribuição mismatch* e as análises do EBSP obtidas para A, D e F são consistentes com o que se espera de populações que estejam sob um modelo de expansão populacional (Excoffier *et al.* 2004). O padrão radial dos haplogrupos A (na rede de haplótipos em Cytb), D

e F (na rede de haplótipos de 16S), também indica que essas populações passaram por processo de expansão.

Na escala temporal recuperada pela análise de EBSP, os grupos A, D, F apresentam indícios de expansão recente, durante o Pleistoceno, desde aproximadamente 0.5 Ma e os demais grupos, possivelmente permaneceram em equilíbrio populacional (Figura 12). Apesar dos testes de desvio de neutralidade terem obtido valores significativos para as populações A, D e F devemos encarar tais resultados com cautela, uma vez que esses testes foram desenvolvidos com base em populações panmíticas (Ray *et al.*, 2003; Excoffier, 2004).

A expansão populacional em D, segundo as estimativas de tempo do EBSP, iniciou-se entre 0.2 e 0.4 Ma e antecede ao período da mudança do curso do rio Tocantins para o sentido nor-nordeste (entre 6 e 8 mil anos atrás), segundo o cenário proposto por Rosseti & Valeriano (2007). Tais resultados reforçam o fato de que o tempo de separação entre as linhagens da ilha do Marajó e leste do rio Tocantins não foi suficiente para ocasionar a divergência entre elas, devido à mudança do curso do rio ter sido um evento extremamente recente (Avila-Pires *et al.*, 2012).

A datação média estimada para a expansão do grupo D (entre 0.3 e 0.2 Ma) está inserida no intervalo do tempo de divergência entre D e E (0.56 - 0.17 Ma), não descartando a hipótese de que a dispersão possa ter levado à diferenciação entre os agrupamentos. O mesmo ocorre com o grupo F, cujo intervalo da data estimada de expansão populacional (0.3 - 0.2 Ma) sobrepõe-se ao intervalo do tempo de separação com o grupo C (0.42 - 0.16 Ma). Ao contrário do que ocorre em D e F, o grupo A expandiu durante um período posterior à diversificação com o grupo B, o que implica que a expansão pode não ter sido o fator que desencadeou a divergência entre esses grupos. Todos os intervalos de tempo de expansão populacional resultantes do EBSP correspondem aos períodos dos máximos glaciais no Pleistoceno.

Os resultados das inferências populacionais não corroboram a divergência entre populações de *Kentropyx calcarata* em simpatria com *K. altamazonica*, e as demais, como encontrado por Gallagher *et al.* (1986). Alguns indivíduos ocorrendo em áreas de simpatria foram arranjados em grupos distintos ou, ainda, agruparam-se com indivíduos localizados em áreas onde não ocorre *K. altamazonica*. Nesse último caso, os baixos níveis de variação genética poderiam implicar que o suposto "*character displacement*" não teria afetado, mesmo indiretamente, nenhum dos genes propostos para esse trabalho.

5 CONCLUSÕES

Os resultados combinados das análises filogenéticas e populacionais envolvendo as dez linhagens de *K. calcarata* assinalam uma espécie com alta capacidade dispersiva, cujos grupos A, D e F indicaram estar em processo de expansão populacional recente (a partir do Pleistoceno médio) na Amazônia oriental. Por ser uma espécie típica de ambientes florestais, *K. calcarata* representa um modelo ideal para estudos de diversificação na Amazônia associados a eventos de alterações na composição vegetacional, diante das oscilações climáticas. Por outro lado, sua preferência por ambientes próximos a cursos d'água não descarta a hipótese de que os indivíduos possam ter dispersado, acompanhado a evolução da drenagem dos rios amazônicos e, posteriormente, terem sido limitados pelos mesmos.

Os tributários da calha sul do rio Amazonas (Tapajós, Xingu e Tocantins) limitam linhagens de *K. calcarata*, nas margens opostas de seus cursos. Altos índices de estruturação foram detectados entre as populações dispostas nas regiões geográficas limitadas por rios. As linhagens do Marajó e Leste do Tocantins foram agrupadas em um só clado, refletindo a recente alteração do curso do rio Tocantins, como previsto no cenário de Rosseti & Valeriano (2007).

O estabelecimento do rio Tapajós pode ter sido o evento vicariante inicial que isolou as linhagens de *K. calcarata* a oeste de seu curso dos demais. A ancestralidade dos indivíduos situados na porção oeste da Amazônia, incluindo a área de endemismo Rondônia (Madeira– Tapajós) também é reportada para outros organismos na Amazônia (Lynch Alfaro *et al.*, 2014, Thom e Aleixo, 2015). Porém, não se pode descartar a hipótese de que os indivíduos de *K. calcarata* poderiam ter se diversificado via dispersão para o leste e norte da Amazônia, em meio à dinâmica das fragmentações florestais ocasionadas pelas oscilações climáticas dos períodos glaciais.

REFERÊNCIAS

As citações e referências bibliográficas seguem as normas propostas pelo *Journal of Biogeography*, disponível no sítio: http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN) 1365-2699/homepage/ForAuthors.html.

- Allendorf, F. W. & Luikart, G. H. (2007) *Conservations and genetics of populations*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Aleixo, A. (2004) Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, **58**, 1303–17.
- Aleixo, A. (2006) Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: a case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 383–396.
- Avila-Pires, T. C. S. (1995) Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). Zoologische Verhandelingen Leiden, 299, 1–706.
- Avila-Pires, T. C. S., Mulcahy, D. G., Werneck, F. P., & Sites Jr., J. W. (2012) Phylogeography of the Teiid Lizard *Kentropyx calcarata* and the Sphaerodactylid *Gonatodes humeralis* (Reptilia: Squamata): Testing a Geological Scenario for the Lower Amazon–Tocantins Basins, Amazonia, Brazil. *Herpetologica*, 68, 272–287.
- Avise, J. C. (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7, 371–379.
- Avise, J. C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**, 3–15.
- Ayres, J. M., Clutton-Brock, T. H. (1992) River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist*, **140**, 531–537.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., Daly, M. J. (2005) Haploview: análise e visualização de mapas e LD haplótipos. Bioinformática. 21, 263-265.
- Batalha-Filho, H., Fjeldsa, J., Fabre, P. H., Miyaki, C. Y., (2013) Connections between the Atlantic and Amazonian forest avifaunas represents distinct historical events. *Journal of Ornithology*, **154**, 41–50.
- Bermingham, E. & Moritz, C. (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367–369.

- Brito, P. H, Edwards, S.V. (2009) Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, **135**, 439–455.
- Chan, L. M., Brown, J. L. & Yoder, A. D. (2011) Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 523-537.
- Cheng, H., Sinha, S. S., Cruz, F. W., Wang, X., Edwards, R. L., D'Horta, F. M., Ribas, C., Vuille, M., Stott, L. D., Auler, A. S. (2013) Climate change patterns in Amazonia and biodiversity. *Nature Comunications*, 4, 1411.
- Corl, A., Davis, A. B., Kuchta, S. R., Comendant, T. & Sinervo, B. (2010) Alternative mating strategies and the evolution of sexual size dimorphism in the side-blotched lizard, *Uta stansburiana*: a popularion-level comparative analysis. *Evolution*, **64**, 79–96.
- Drummond, A. J, Rambaut A., Shapiro B., Pybus O. G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185–1192
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Rawlence, N., Rambaut, A. (2007) A Rough Guide to BEAST 1.4. University of Auckland, New Zealand, 1 41.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, **14**, 2611–20.
- Excoffier, L. (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, **13**(**4**), 853–864.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47– 50.
- Figueiredo, J., Hoorn, C., Van der Ven, P. & Soares, E. (2009) Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*, 37, 619–622.
- Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., Dill Orrico, V.G., Lyra, M., Joventino, I., Kok, P., Haddad, C.F.B. & Rodrigues, M.T. (2012a) From Amazonia to the Atlantic Forest: molecular phylogeny of Phyzel- aphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern that stress out conservation status. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65, 547–556.

- Fouquet, A., Ledoux, J.-B., Dubut, V., Noonan, B.P. & Scotti, I. (2012b) The interplay of dispersal limitation, rivers and his- torical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog. *Biological Journal of the Linnean Society*, **106**, 356–373.
- Frankham, R., Ballou, J. D. e Briscoe, D. A. (2008) *Fundamentos da genética da conservação*. Sociedade Brasileira de Genética (Eds), Ribeirão Preto, São Paulo. 280p.
- Fu, Y. X. (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, 143, 557–70.
- Funk, W. C., Caldwell, J. P., Peden, C. E., Padial, J. M., De la Riva, I., Cannatella, D. C. (2007) Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 825 – 837.
- Gallagher, D. S., Dixon, J. R., Schmidly, D. J. (1986) Geographic Variation in the *Kentropyx* calcarata species group (Sauria: Teiidae): A possible example of morphological character displacement. *Journal of Herpetology*, **20**, 179–189.
- Gallagher, D. S. & Dixon, J. R. (1992) Taxonomic revision of the South American lizard genus Kentropyx Spix (Sauria, Teiidae). Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali- Torino, 10, 125–171.
- Gascon, G., Malcolm, J. R., Patton, J. L., Silva, M. N. F., Bogart, J. P., Lougheed, S. C., Peres, C. A., Neckel, S. & Boag, P.T. (2000) Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (25), 13672-13677.
- Geurgas, S. R., Rodrigues, M. T. (2010) The hidden diversity of *Coleodactylus amazonicus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revealed by molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 583–593.
- Giugliano, L. G., Collevatti, R. G., Colli, G. R. (2007) Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45, 168–179.
- Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian Forest Birds. Science, 165, 131–137.
- Haffer, J. & Prance, G. T. (2001) Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, **16**, 579–607.
- Haffer, J. (2008) Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Brazilian Journal* of Biology, **68**, 917–47.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-frendly biological sequence aligment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–96.

- Hall, J. P. & Harvey, D. J. (2002) The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from Riodinid butterflies. *Evolution*, 56, 1489–1497.
- Harpending, R. C. (1994) Signature of ancient population growth in low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, 591–600.).
- Heled, J. & Drummond, A. J. (2008) Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology* 8, 289.
- Henderson, R. W., Passos, P., Feitosa, D. (2009) Geographic Variation in the Emerald Treeboa, *Corallus caninus* (Squamata: Boidae). *Copeia*, 3, 572–582.
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P. F. & Yoder, A. D. (2011). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291-301.
- Hillis, D. M. & Bull, J. J. (1993) An empirical test of bootstraping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, **42**, 182–192.
- Hoorn, C., Wesselingh, F. P., Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., Jaramillo, C., & Riff, D. (2010) Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science*, 330, 927–931.
- Huelsenbeck, J. P. & Hall, B. (2001) Mrs. Bayes: Bayesian inference of phylogeny, a program for the Bayesian Analysis. Disponível em: http://brahms.biology.rochesters.edu/ software.html.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–6.
- Katoh, K. & Standley D. M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 4, 772–780
- Knowles, L. L. & Carstens, B. C. (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. Systematic Biology, 56, 887–895
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W. & Guindon, S. (2012) Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1695–701.

- Leite, R. & Rogers, D. (2013) Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. Organisms Diversity & Evolution, 13, 639–664.
- Lynch Alfaro, J. W., Boubli, J. P., Paim, F. P., Ribas, C. C., Silva, M. N. F., Messias, m. R., Röhe, F., Mercês, M. P., Silva Júnior, J. S., Silva, C. R., Pinho, G. M., Koshkarian, G., Nguyen, M. T. T., Harada, M. L., Rabelo, R. M., Queiroz, H. L., Alfaro, M. E., Farias, I. P. (2014) Biogeography of squirrel monkeys (genus Saimiri): South-central Amazon origin and rapid pan-Amazonian diversification of a lowland primate. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **76**, 705–720.
- Losos, J. B. (2009) *Lizards in a Evolucionary tree: Ecology and Adaptative Radiation of Anoles.* University of California Press.
- Macey, J. R., Schulte II, J. A., Ananjeva, N. B., Larson, A., Rastegar-Pouyani, N., Shammakov, S. M. & Papenfuss, T. J. (1998) Phylogenetic Relationships among Agamid Lizards of the *Laudakia caucasia* Species Group: Testing Hypotheses of Biogeographic Fragmentation and an Area Cladogram for the Iranian Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **10**, 118–131.
- Maciel, N. M., Collevatti, R. G. Colli, G. R., Schwartz, E. F. (2010) Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 787-797.
- Maldonado-Coelho, M., Blake, J. G., Silveira, L. F., Batalha-Filho, H., Ricklefs, R. E. (2013)
 Rivers, refuges and population divergence of fire-eye antbirds (*Pyriglena*) in the Amazon
 Basin. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 1090–1107.
- Meier, R., S. Kwong, G. Vaidya, P. K. L. Ng. (2006) DNA Barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. Systematic Biology, 55: 715-728.
- Milá, B., Toews, D.P.L., Smith, T.B. & Wayne, R.K. (2011) A cryptic contact zone between divergent mitochondrial DNA lineages in southwestern North America supports past introgressive hybridization in the yellow-rumped warbler complex (Aves: *Dendroica coronata*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 696-706
- Miller, M. P. (2005) Alleles in Space (AIS). A computer program for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**, 722-723.

- Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.
- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J., Smith, T. B. (2000) Diversification of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **31**, 533–563.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillian, W. O., Stice, L. & Grabowski, G. (1991) *The simple fool's guide to PCR*. Departament of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.
- Patton, J. L., Da Silva, M. N. F., Malcolm, J. R. (1994) Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*, 48, 1314–1223.
- Patton, J. L., Dos Reis, S. F., Silva, M. N. F. (1996) Relationship among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene. Journal of Mammalian. *Evolution*, **3**, 3–39.
- Patton, J. L. & Silva, M. N. (1998) Rivers, Refuges and Ridges: The Geography of Speciation of Amazonian Mammals. *Endless Forms: Species and Speciation*. (ed. By D. J. Howard and S. H. Berlocher), pp. 202–213. Oxford University Press, New York.
- Patton, J. L., Silva, M. N. F., Malcolm, J. R. (2000) Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Buletim of the American Museum of Natural History*, 244, 1–306.
- Posada, D., Guindon, S., Gascuel, O. (2003) In press: jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and evolution. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–59.
- Quijada-Mascareñas, J. A., Ferguson, J. E., Pook, C. E., Salomão, M. G., Thorpe, R. S., Wüster, W. (2007) Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. *Journal of Biogeography*, 34, 1296-1312.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.URL http://www.R-project.org/.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. (2007) Tracer, version 1.5. Available at: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/.

- Ray N., Currat, M., Excoffier, L. (2003) Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Molecular Biology and Evolution*, **20**(1), 76–86.
- Ribas, C. C. & Miyaki, C. Y. (2004) Molecular systematics in *Aratinga parakeets*: Species limits and historical biogeography in the 'solstitialis' group, and the systematic position of Nandayus nenday. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**, 663–675.
- Ribas, C. C., Miyaki, C. Y., Gaban-Lima, R. (2005) Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus "Pionopsitta" (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography*, **32**, 1409–1427.
- Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C. R., Miyaki, C. Y., Cracraft, J. (2012) A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of The Royal Society B*, **279**, 681–689.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.
- Rossetti, D. F., Toledo, P. M. & Góes, A. M. (2005) New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research*, 63, 78–89.
- Rossetti, D. F. & Mann de Toledo, P. (2007) Environmental changes in Amazonia as evidenced by geological and paleontological data. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 15, 175–188.
- Rossetti, D. F. & Valeriano, M. M. (2007) Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. *Catena*, **70**, 253–265.
- Rozas, J. & Rozas, R. (1999) DNASP, version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**,174–175.
- Sambrook, J. & Russell, D. M. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sick, H. (1967) Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. *Atlas do Simpósio Biota Amazônica Zoológica*, **5**, 495–520.
- Silva, M. N. F. & Patton, J. L. (1998) Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology*, 7, 475–486.
- Stamatakis, A. (2014): "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In *Bioinformatics*, open access link: http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033 abstract3?keytype=ref&ijkey=VTEqgUJYCDcf0kP

- Stephens, M., Smith, N. & Donnelly, P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68, 978– 989.
- Stephens, M. & Donnelly, P (2003) A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73, 1162–1169.
- Sturaro, M. J. & Avila-Pires, T. C. S. (2011) Taxonomic revision of the geckos of the Gonatodes concinnatus complex (Squamata: Sphaerodactylidae), with description of the new species. Zootaxa, 2869, 1–36.
- Tajima, F. (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, **143**, 1457–1465.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- Thom, G. e Aleixo, A (2015) Cryptic speciation in the white-shouldered antstrike (*Thamnophilus aethiops*, Aves Tamnophylidae): The tale of a transcontinental radiation across rivers in lowland Amazonia and the northeeastern Atlantic Forest. *Molecular phylogenetics and Evolution*, **82**, 95-110.
- Townsend, T. M., Alegre, R. E., Kelley, S. T., Wiens, J. J., Reeder, T. W. (2008) Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: an example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 129– 142.
- Vanzolini, P.E. & Wiliams, E.E. (1970) South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). Part 1. *Arquivos de Zoologia* (São Paulo), **19**, 1–124.
- Vitt, L. J. (1991) Ecology and life-history of the widely foraging lizard *Kentropyx calcarata* (Teiidae) in Amazonian Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2791–2799.
- Wallace, A.R. (1852) On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **20**, 107–110.
- Werneck, F. P., Giugliano L. G., Collevatti, G. G., Colli, G. R. (2009). Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Molecular Ecology*, 18, 262–278.
- Wesselingh, F. P., Hoorn, C., Kroonenberg, S. B., Antonelli, A., Lundberg, J. C., Vonhof, H.B. & Hooghiemstra, H. (2010) On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity:

A Synthesis. *Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (ed. by C. Hoorn & F. P. Wesselingh), pp. 421–431. Blackwell Publishing, Oxford.

- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Wüster, W., Ferguson, J. E., Quijada-Mascareñas, J. A., Pook, C. E., Salomão, M. G., Thorpe,
 R. S. (2005) Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the
 Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology*,
 14, 1095–1108.
- Xia, X. & Z. Xie. 2001. DAMBE: data analysis in Molecular Biology and evolution. *Journal of Heredity*, **92**, 371–373.

Regiões/Interflúvios	Nº amostras	Etiquetas
Leste do rio Jari = 22		
Laranjal do Jari-AP	3	MPEG 29901; MPEG 29902; AP462
Macapá-AP	7	ACS 013, ACS 018, ACS 019, ACS 021, ACS 029, ACS 033, ACS 034
Mazagão-AP	6	MPEG 29889; MPEG 29895; MPEG 29893; MPEG 29888; MPEG 29894; MPEG 29886
Serra do Navio-AP	6	ACS 041, ACS 052, ACS 058, ACS 060, AP 228, AP 240
Ilha do Marajó = 12		
Afuá-PA (Rio Preto)	2	MPEG 29587; MPEG 29589;
Chaves-PA (Fazenda Tauari)	7	MJH 32; MJH 64; MJH 63; MJH 45; MJH 44; MJH 62; MJH 52
Santa Cruz do Arari-PA	3	TCAP 3383; TCAP 3376; TCAP 3377;
Leste do rio Tocantins = 11		
Barcarena-PA (Vila dos Cabanos)	1	MPEG 27029;
Cametá-PA	1	MSH 12019
Garrafão do Norte-PA	3	MSH 10773; MSH 10775; MSH 10766
Outeiro-PA	1	OUT 013
Tailândia-PA	3	AAGARDA 865; AAGARDA 884; AAGARDA 864
Santa Bárbara (Gunma)	1	MPEG 28013
UHE Tucuruí-PA	1	MSH 12105
Interflúvio Madeira-Tapajós = 40		
FLONA do Jamari-RO	3	FJ 25; FJ 142; FJ 140
Guajará-Mirim-RO (PARNA Serra da Cutia)	1	MPEG 21364
Itaituba-PA (PARNA Amazônia)	11	MPEG 22296; MPEG 22303; MPEG 29486; MPEG 29484; PRMT 145; PRMT 146; PRMT 148; MPEG 29485; PRMT 237; MPEG 22301; MPEG 22297
Juruti-PA (Acampamento Mutum)	5	MPEG 20804; MPEG 20805; MPEG 20820; MPEG 25124 ; MPEG 21862
Juruti-PA (ALCOA Platô Capiranga)	5	MPEG 25011; MPEG 25012; MPEG 25014;MPEG 25015;MPEG 25125
Juruti-PA (Base Barroso)	1	MPEG 21864
Juruti-PA (Pacoval)	3	MPEG 26524; MPEG 27836; MPEG 27837
Maués-AM (Rio Paraconi)	3	MPEG 27661; MPEG 27662; MPEG 27664
Resex Tapajós Arapiuns-PA (Alto Mentae)	1	MSH 11068
Resex Tapajós Arapiuns-PA (Capixauã)	4	HERP 5295; HERP 5354; HERP 5356; HERP 5370
Resex Tapajós Arapiuns-PA (Tucumatuba)	3	HERP 5890; HERP 5831; HERP 5827
Oeste do rio Trombetas = 4		
Itacoatiara-AM	1	MPEG 29306
Oriximiná-PA	2	MPEG 24778; MPEG 29246;
Urucará-AM (Marajatuba)	1	MPEG 29309;
Interflúvio Tapajós-Xingu = 38		
Altamira-PA	2	MPEG 28522; MPEG 28525
Itaituba-PA (Aldeia Nova)	1	MPEG 30016
Itaituba-PA (Mina do Palito)	7	MPEG 29107; MPEG 29108; JOG 773; JOG 756; JOG 810; JOG 811; JOG 779
Itaituba-PA (Mina do Tocantinzinho)	4	MPEG 29047; MPEG 29050; MPEG 29051; MPEG 29052
Itaituba-PA (Pimental)	3	MPEG 29482; MPEG 29483; PRMT 082

Anexo 1 – Amostras de tecidos de Kentropyx calcarata e seus respectivos interflúvios e localidades

São Félix do Xingu-PA (PARNA Serra do Pardo)	12	MSH 11815; MSH 11817 ; MSH 11763; MSH 11765; MSH 11655; MSH 11669; MSH 11670; MSH 11812; MSH 11830; MSH 11840; MSH 11768; MSH 11764
Vitória do Xingu-PA (UHE Belo Monte. Bom Jardim)	9	MPEG 24827; MPEG 24828; MPEG 24831; MPEG 24832; MPEG 24829; MPEG 24830; MPEG 24834; MPEG 24835; MPEG 24836
Interflúvio Trombetas-Jari = 76		
Almeirim-PA (FLOTA Paru)	29	MPEG 26752; MPEG 26753; MPEG 26754; MPEG 26755; MPEG 26756; MPEG 26757; MPEG 26758; MPEG 26759; MPEG 26760; MPEG 26761; MPEG 26762; MPEG 26763; MPEG 26764; MPEG 26765; MPEG 26766; MPEG 26767; MPEG 26768; MPEG 26772; MPEG 26773; MPEG 26774; MPEG 26777; MPEG 26727; MPEG 26781; MPEG 26782; MPEG 26784; MPEG 26785; MPEG 26779; MPEG 26769; MPEG 26775
Almeirim-PA (Monte Dourado)	15	MPEG 23887; MPEG 23882; MPEG 23889; MPEG 23891; MPEG 23894; MPEG 23878; MPEG 23883; MPEG 23885; MPEG 23890; MPEG 23849; MPEG 23851; MPEG 23855; MPEG 23862; MPEG 23864; MPEG 22042
Almeirim-PA (REBIO Maicuru)	24	MPEG 26706; MPEG 26693; MPEG 26694; MPEG26695; MPEG 26703; MPEG26730; MPEG 26732; MPEG 26747; MPEG 26698; MPEG 26707; MPEG 26710; MPEG 26716; MPEG 26718; MPEG 26700; MPEG 26708; MPEG 26722; MPEG 26696; MPEG 26705; MPEG 26709; MPEG 26713; MPEG 26714; MPEG 26720; MPEG 26721; MPEG 26723
Óbidos-PA (FLOTA Trombetas)	8	MPEG 26683; MPEG 26684; MPEG 26685; MPEG 26686; MPEG 26687; MPEG 26689; MPEG 26690; MPEG 26688
Interflúvio Xingu-Tocantins = 57		
Anapu-PA (UHE Belo Monte)	2	MPEG 24832; MPEG 24845
UHE Estreito	3	MPEG 27056; MPEG 27057; MPEG 27058
Marabá-PA	2	ALPA 113; ALPA 114
Marabá-PA (FLONA Tapirapé-Aquiri)	1	OUT 013
São Félix do Xingu-PA	2	LOD 769; LOD 770;
São Geraldo do Araguaia-PA (Serra das Andorinhas)	3	MPEG 31054; MPEG 31053; MPEG 31052
Senador José Porfírio-PA	3	LOD 476; LOD 578; LOD 579
Portel-PA (Faz. Riacho Monte Verde)	7	MPEG 24686; MPEG 24687; MPEG 24689; MPEG 24690; MPEG 24691; MPEG 24693; MPEG 24694
Portel-PA (FLONA Caxiuanã. Leste do Rio Anapu)	5	MSH 11619; MSH 11621; MSH 11519; MSH 11520; MPEG 28943
Portel-PA (FLONA Caxiuanã. PLOT PPBIO. Oeste do Rio Anapu)	29	MPEG 25860; MPEG 25862; MPEG 25864; MPEG 25870; MPEG 25873; MPEG 25874; MPEG 25875; MPEG 25876; MPEG 25877; MPEG 25879; MPEG 25881; MPEG 25883; MPEG 25849; MPEG 25850; MPEG 25851; MPEG 25852; MPEG 25853; MPEG 25854; MPEG 25856; MPEG 25857; MPEG 25859; MPEG 26328; MSH 11597; MSH 11601; MSH 11536; MPEG 24684; MPEG 24685; MARJ 1086; MARJ 876

Total geral = 260