

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL

NÁDIA FRANCO PISETTA

FILOGENIA MOLECULAR DE *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO, VERONESE,  
BUJES & DIAS FIALHO, 2003 (IGUANIA: LIOLAEMIDAE)

Imbé, 2013

NÁDIA FRANCO PISETTA

FILOGENIA MOLECULAR DE *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO, VERONESE,  
BUJES & DIAS FIALHO, 2003 (IGUANIA: LIOLAEMIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Nelson J. R. Fagundes

Coorientadora: Profa. Dra. Laura Verrastro

Imbé, 2013

Este trabalho foi elaborado conforme as normas de GRANDI, Cleciet *al.* **Orientações para elaboração e apresentação de trabalhos e relatórios acadêmicos.** Porto Alegre: UERGS, 2010. 95p., que segue as normas da ABNT.

P678f Pisetta, Nádia Franco  
Filogenia molecular de *Liolaemus arambarensis* Verrastro,  
Veronese, Bujes & Dias Filho, 2003 (Iguania: Liolaemidae)  
/ Nádia Franco Pisetta. -- 2013.  
44 f.

Orientador: Nelson Jurandi Rosa Fagundes.  
Coorientadora: Laura Verrastro.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado)-- Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências e  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências  
Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira,  
Imbé/Osório, BR-RS, 2013.

1. *Liolaemus arambarensis* Verrastro, Veronese, Bujes & Dias  
Filho, 2003 (Iguania: Liolaemidae). 2. Filogenia molecular de  
I. Fagundes, Nelson Jurandi Rosa, orient.  
II. Verrastro, Laura, coorient.  
III. Título.

NÁDIA FRANCO PISETTA

FILOGENIA MOLECULAR DE *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO, VERONESE,  
BUJES & DIAS FIALHO, 2003 (IGUANIA: LIOLAEMIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas, ênfase em Gestão  
Ambiental Marinha e Costeira da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, em parceria com a Universidade  
Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Nelson J. R.  
Fagundes

Coorientadora: Profa. Dra. Laura  
Verrastro

Aprovado em:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Márcio Borges Martins

---

Dr. Geraldo Mäder

Coordenador da atividade

Trabalho de conclusão II - CBM

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Ott

## RESUMO

A análise filogenética é empregada para inferir a história evolutiva das espécies, sugerindo possíveis eventos que afetaram sua diversificação. *Liolaemus arambarensis*, descrito recentemente, é um lagarto pequeno endêmico das restingas da margem oeste da Laguna dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul. Nesse estudo, foi utilizado um conjunto de dados de quatro locos genéticos independentes (dois genes mitocondriais (mtDNA) analisados em conjunto, e três locos autossômicos independentes) foi usado para inferir a relação filogenética entre essa e outras espécies proximamente relacionadas pertencentes ao subgrupo “*wiegmannii*”: *L. lutzae*, *L. occipitalis*, *L. salinicola*, *L. scapularis*, *L. multimaculatus* e *L. wiegmannii*. Uma árvore de gene foi estimada para cada marcador independente através das abordagens Bayesiana e de máxima verossimilhança, enquanto a árvore de espécies foi feita usando dados concatenados ou baseada em uma abordagem Bayesiana de coalescência, permitindo lidar explicitamente com as discrepâncias entre as árvores de gene. Para calibrar o relógio molecular foi utilizada uma taxa de substituição para o gene CytB descrita na literatura e definido um prior na raiz da árvore usando resultados da literatura tendo *L. darwini* como grupo externo. As análises realizadas neste estudo suportam a relação irmã entre *L. arambarensis* e *L. lutzae*, obtida para ambas as árvores de espécie (coalescente e concatenada). Embora a filogenia do mtDNA sugira o clado (*L. occipitalis*, *L. arambarensis*) com baixo suporte, esse agrupamento alternativo não é suportado por nenhuma árvore de gene nuclear nem pelas árvores de espécie nucleares. Uma hipótese alternativa para a contradição encontrada, poderia ser uma antiga introgressão do mtDNA entre *L. arambarensis* e *L. occipitalis*. Em relação à estrutura filogenética apresentada por *L. wiegmannii*, os dados sustentam uma divergência entre duas linhagens filogenéticas separadas pelo rio da Prata: *L. wiegmannii*-ARG e *L. wiegmannii*-UY. No que se refere as estimativas dos tempos de divergência, as linhagens que acabaram originando *L. arambarensis* e *L. lutzae*, surgiram durante o Plioceno, e esse fato podem estar relacionados à fragmentação de sua zona de ocorrência ancestral devido a elevação das montanhas costeiras brasileiras. De mesma forma, a linhagem que deu origem a *L. occipitalis* surgiu durante o Plioceno,

sendo muito mais antiga do que a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, indicando que a espécie só colonizou a região quando essa tornou-se disponível. Para *L. wiegmanni*, os subclados uruguaio e argentino hoje separados pelo Rio da Prata, podem estar relacionados à barreira geológica marinha relacionada à formação Puerto Olivos. Esse estudo mostra que a filogenia molecular do grupo “*wiegmanni*”, em geral, e de *L. arambarensis* em particular, pode fornecer indicações relevantes dos processos históricos que ajudaram a moldar a grande diversidade de espécies desse gênero de lagartos.

PALAVRAS-CHAVE: Árvore de espécies. Árvore de gene. Lagarto de areia. Coalescência. Concatenação. Relógio molecular.

## ABSTRACT

Phylogenetic analysis has been used to infer the evolutionary history of the species, suggesting possible events that affected their diversification. *Liolaemus arambarensis*, recently described, is a small lizard endemic to the marshes of the western edge of the Patos Lagoon, in the state of Rio Grande do Sul. In this study, a data set of four independent genetic loci (two mitochondrial genes (mtDNA) which were analyzed together, and three independent autosomal loci) was used to infer the phylogenetic relationship between this and other closely related species belonging to the subgroup "*wiegmannii*": *L. lutzae*, *L. occipitalis*, *L. salinicola*, *L. scapularis*, *L. multimaculatus* and *L. wiegmannii*. A gene tree was estimated for each independent marker through Bayesian and maximum likelihood approaches, while the species tree was inferred using concatenated data or based on a coalescence approach which deals explicitly with the discrepancies between gene trees. To calibrate the molecular clock rate we used a substitution rate for the gene CytB described in the literature, and a prior was defined on the root of the tree using results from the literature and *L. darwini* as an outgroup. The analyses performed in this study support the sister relationship between *L. arambarensis* and *L. lutzae*, which was obtained for both species trees (concatenated and coalescent). Although the mtDNA phylogeny suggested the clade (*L. occipitalis*, *L. arambarensis*) with low support, this alternative grouping was not supported by any nuclear gene trees or nuclear species trees. An alternative hypothesis for this contradiction could involve an ancient mtDNA introgression between *L. arambarensis* and *L. occipitalis*. Regarding the phylogenetic presented by *L. wiegmannii*, the data support the divergence between two lineages separated by the La Plata river: *L. wiegmannii*-ARG and *L. wiegmannii*-UY. Regarding the estimates of divergence times, the lineages originating *L. arambarensis* and *L. lutzae* emerged during the Pliocene, and this fact may be related to the fragmentation of its ancestral range caused by the uplift of the Brazilian coastal mountains. Likewise, the lineage originating *L. occipitalis* originated in the Pliocene, being much older than the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, indicating that the species colonized this region only when it became available. For *L. wiegmannii*, the Argentine and Uruguayan subclades are nowadays separated by the

La Plata river, which may be related to the Puerto Olivos formation. This study shows that the molecular phylogeny of the "*wiegmannii*" group in general, and of *L. arambarensis* in particular may reveal important information about the historical processes which contributed to the high species diversity of the lizard genus.

KEY WORDS: Species tree. Gene tree. Sand lizard. Coalescence. Concatenation. Molecular clock.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>10</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A análise filogenética é empregada para inferir a história evolutiva das espécies. Principalmente quando aliada a métodos de datação, essa análise pode sugerir possíveis eventos que afetaram o surgimento e a diversificação das espécies. *Liolaemus arambarensis* é um lagarto pequeno descrito recentemente, endêmico das restingas da margem oeste da Laguna dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul. No Brasil, outras espécies do gênero ocupam as praias da costa Atlântica, mas a relação evolutiva entre elas é desconhecida. Enquanto *Liolaemus occipitalis* ocorre no Sul do Brasil e no Uruguai, próximo à área de ocorrência de *L. arambarensis*, *L. lutzae* é uma espécie restrita ao estado do Rio de Janeiro, distante mais de 1.000 km das outras espécies do gênero. Nesse estudo, foi utilizado um conjunto de dados de múltiplos marcadores de sequência de DNA com o objetivo geral de inferir a relação filogenética de *L. arambarensis* em relação outras espécies proximamente relacionadas pertencentes ao grupo *boulengeri*, e mais especificamente, ao subgrupo “*wiegmannii*”, inferindo os tempos de divergência entre as espécies que poderão ser interpretados em um contexto geológico. Os objetivos específicos foram: 1) estimar a árvore de gene para cada marcador amplificado e comparar os resultados; 2) estimar a árvore de espécies a partir de dados concatenados; 3) estimar a árvore de espécies sem concatenação através de métodos que levem em conta explicitamente o processo de coalescência de linhagens genéticas; e, finalmente, 4) comparar as árvores de espécies estimadas a partir dos diferentes métodos utilizados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A reconstrução filogenética utilizando dados moleculares é empregada para inferir a história evolutiva das espécies, sendo assim um foco de estudo importante em biologia evolutiva. Ela assume que todas as espécies surgem de um ancestral comum e que o material genético é transmitido dos ancestrais para os descendentes ao longo do tempo. Dessa forma, através da informação genética codificada em sequências de DNA de espécies atuais, é possível investigar a evolução em direção ao ancestral comum mais recente das espécies. Existe uma literatura extensa acerca dos diferentes métodos que podem ser usados para a reconstrução filogenética usando dados moleculares, e uma boa revisão pode ser encontrada em FELSENSTEIN, 2004. Uma discussão extensa desses métodos foge ao objetivo do presente trabalho e apenas aspectos mais diretamente aplicáveis aos objetivos listados acima serão discutidos em maior profundidade a seguir.

Até há pouco tempo, os estudos filogenéticos moleculares tipicamente envolveram sequenciar o gene de um indivíduo de um grupo de espécies, estimar a árvore de gene para as sequências, e assumir a árvore de gene como sendo a estimativa da filogenia das espécies (p. ex. HILLIS; MORTIZ; MABLE, 1996). Porém, enquanto uma árvore de espécies verdadeira deve ser capaz de abrigar a variação da história genética de diferentes marcadores genéticos, a árvore de gene representa apenas a história das sequências de um único loco. Além disso, a história evolutiva das espécies, principal foco de atenção de estudos de filogenia molecular, pode ser distinta de determinadas árvores de genes (DEGNAN; ROSENBERG, 2006).

A maneira mais simples de incluir dados de múltiplos genes para análise filogenética conta com a concatenação dos diferentes marcadores em um único “supergene” (ou “supermatriz”) para que procedimentos tradicionais de inferência filogenética sejam aplicados (p. ex. ROKAS *et al.* 2003). Porém, estudos de simulação constataram que a concatenação é inconsistente em uma “zona anômala” (KUBATKO; DEGNAN, 2007) na qual a maioria das árvores de gene não condizem com a árvore de espécies (DEGNAN; ROSENBERG, 2006). Ainda assim, a concatenação parece produzir resultados razoáveis para uma ampla variedade de formas e profundidades de árvores filogenéticas, especialmente em filogenias caracterizadas por ramos longos, quando esses são medidos em unidades

coalescentes (i.e. dependente do produto entre o tamanho populacional efetivo e o tempo associado ao ramo) (BRITO; EDWARDS, 2009).

Entretanto, os valores de suporte obtidos para essa abordagem parecem ser inflados, e valores altos para clados incorretos ou cujo suporte verdadeiro é baixo podem ser observados com frequência (KUBATKO; DEGNAN, 2007). Um outro problema da concatenação é que ela ignora o fato de que a árvore de gene pode ser diferente da filogenia para o grupo de espécies de interesse (árvore de espécies) (DEGNAN; SALTER, 2005; DEGNAN; ROSENBERG, 2006). Esse problema pode ser relativamente comum devido à estocasticidade do processo de coalescência ocorrido em populações ancestrais, especialmente quando a árvore de espécies têm ramos curtos (i.e. quando o intervalo de tempo entre eventos de separação é curto, quando o tamanho efetivo da população ancestral é grande, ou ambos) (DEGNAN; SALTER, 2005; DEGNAN; ROSENBERG, 2009). Assim, apesar da concatenação poder resultar em uma árvore bem apoiada, mas incorreta, ela é amplamente utilizada em grande parte por causa da falta de alternativas (discutido em HELED; DRUMMOND; 2010), embora a utilização de métodos que incorporassem de modo explícito a variação nas histórias dos genes individuais fosse desejável (KUBATKO; DEGNAN, 2007; HELED; DRUMMOND; 2010).

A árvore de gene representa a história evolutiva dos alelos contidos nas espécies estudadas sob uma perspectiva genealógica, e por isso deve ser estudada através de modelos probabilísticos que incorporam a distribuição da probabilidade das árvores de gene condicionada a uma árvore de espécies (LIU; YU; KUBATKO *et al.* 2009). Vários processos podem levar à heterogeneidade da árvore de gene e à sua discordância com a árvore de espécies tais como erro de estimação, transferência horizontal de genes, duplicação/perda de genes, introgressão, e sorteio de linhagens incompleto (*incomplete lineage sorting*) ou anômalo devido a processos coalescentes (DEGNAN; ROSENBERG, 2006). Alguns métodos descritos recentemente têm explicitamente levado em conta a heterogeneidade da árvore de gene devido ao sorteio de linhagens (incompleto ou anômalo) dentro da estimativa da árvore de espécies, baseados no modelo de coalescência multiespécies (RANNALA; YANG, 2003; DEGNAN; ROSENBERG, 2009; HELED; DRUMMOND; 2010). Tais modelos têm ocasionado o desenvolvimento de métodos de árvore de espécie baseados em máxima verossimilhança (MV) e em abordagens Bayesianas

(p. ex. LIU, YU, KUBATKO *et al.* 2009; HELED; DRUMMOND; 2010, respectivamente).

Uma maneira simples e eficaz de datar eventos evolutivos é através da teoria do relógio molecular, desenvolvida a partir dos anos 60 e que supõe uma taxa de evolução constante ao longo do tempo (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965). Para uma revisão mais atual, ver BROMHAM; PENNY, 2003). De acordo com o relógio molecular, o número esperado de substituições entre as sequências da amostra de um par de espécies aumenta linearmente com o tempo de divergência. Por sua vez, a capacidade de estimar datas para eventos evolutivos permite compreender padrões biogeográficos de diversificação das espécies. O relógio pode ser calibrado usando informações externas sobre eventos geológicos ou registro fóssil (YANG; RANNALA, 2006), e, em versões mais modernas do relógio molecular, o padrão de substituições não precisa estar linearmente correlacionado com o tempo em todos os ramos (p. ex. DRUMMOND *et al.*, 2006).

O gênero *Liolaemus* WIEGMANN, 1834 de lagartos da América do Sul é um dos gêneros de lagartos mais amplamente distribuídos e ricos em espécies no mundo, com aproximadamente 231 espécies reconhecidas (BREITMAN *et al.* 2011). As espécies do gênero estão distribuídas desde a costa central do Peru em direção ao sul através da Bolívia, Paraguai, Chile, e Argentina, atingindo a costa atlântica do Uruguai e sul e sudeste do Brasil (ETHERIDGE & ESPINOZA 2000). Nos últimos 15 anos mais de 50 espécies foram descritas, principalmente na Argentina e no Chile. Novas coletas estão sendo feitas em áreas não exploradas dos Andes e da Patagônia (ABDALA *et al.* 2008, ÁVILA *et al.* 2010a, b), sendo esse fato uma das principais causas deste acentuado e crescente número de espécies descritas. Um estudo minucioso de um único complexo de espécies sugeriu que o número total de espécies atuais pode ser quase o triplo do número conhecido da época (MORANDO *et al.* 2003).

Os lagartos do gênero *Liolaemus* são de tamanho médio a pequeno, ocorrem na região sul da América do Sul, ocupando diversos habitats, desde o nível do mar até 5.000 metros de altitude (ETHERIDGE 2000). O gênero possui grande flexibilidade ecológica, sendo que a maior parte das espécies é insetívora, encontrando-se também algumas herbívoras e onívoras. A reprodução é basicamente ovípara, existindo algumas formas vivíparas. Seu padrão de coloração é variável, frequentemente críptico (DONOSO-BARROS 1966).

As regiões de abrangência de *Liolaemus* contêm largas áreas de areia eólica, como as praias arenosas do Chile, Argentina Uruguai e sul do Brasil, bem como areias planas e sistemas de dunas espalhados por todo o interior da Argentina e Chile (ETHERIDGE 2000). No Brasil, o gênero *Liolaemus* é representado por três espécies: *Liolaemus lutzae* MERTENS, 1938; *Liolaemus occipitalis* BOULENGER, 1885 e *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO *et al.*, 2003.

Inclusos no gênero *Liolaemus* há três grupos: grupo *nitidus*, grupo *signifer* e grupo *boulengeri*, e dentro deste último reconhece-se o subgrupo “*wiegmannii*”. Com exceção de *L. wiegmanni* que é considerada como sendo a espécie menos especializada, todas as espécies do subgrupo “*wiegmannii*” são exclusivamente arenícolas (LAURENT 1983, 1984; HALLOY *et al.* 1998; ETHERIDGE 2000). ETHERIDGE (2000) concebeu uma análise filogenética do grupo *boulengeri*, baseada em 39 caracteres morfológicos e comportamentais; desse grupo, diferencia-se um clado totalmente isolado, o subgrupo “*wiegmannii*”. Este trabalho realizado por ETHERIDGE (2000), junto com outros estudos morfológicos, comportamentais e moleculares (ETHERIDGE 1995; HALLOY *et al.* 1998; SCHULTE *et al.* 2000; AVILA *et al.* 2006; PINCHEIRA-DONOSO *et al.* 2008, corrobora a monofilia do subgrupo “*wiegmannii*”.

O subgrupo “*wiegmannii*” inclui onze espécies (Figura 1):

- *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO *et al.*, 2003: ocorre nos ambientes de restinga da margem oeste da Laguna dos Patos (desde Itapuã até São Lourenço do Sul), Rio Grande do Sul, Brasil (VERRASTRO *et al.* 2003);

- *Liolaemus azarai* ÁVILA, 2003: encontrado na Ilha Yacyreta (localidade tipo) no Paraguai, e somente em outras duas localidades da província de Corrientes, nordeste da Argentina (ÁVILA, 2003).

- *Liolaemus cuyumhue* ÁVILA *et al.*, 2009: ocorrência conhecida somente para o Departamento de Añelo (localidade tipo), Província de Neuquén, Argentina (ÁVILA *et al.* 2009).

- *Liolaemus lutzae* MERTENS, 1938: ocorre nas restingas da costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil (ROCHA, 1985), sendo endêmico da região;

- *Liolaemus multimaculatus* (DUMÉRIL & BIBRÓN, 1837): nas regiões costeiras de Buenos Aires e do Rio Negro, Argentina (ETHERIDGE, 2000);

- *Liolaemus occipitalis* BOULENGER, 1885: ocorre no litoral do extremo sul do Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina (PETERS *et al.*

1986; LEMA, 1994), e na costa do Uruguai (desde Barra Del Chuy até a margem esquerda do Arroio Valizas) (VERRASTRO *et al.* 2006);

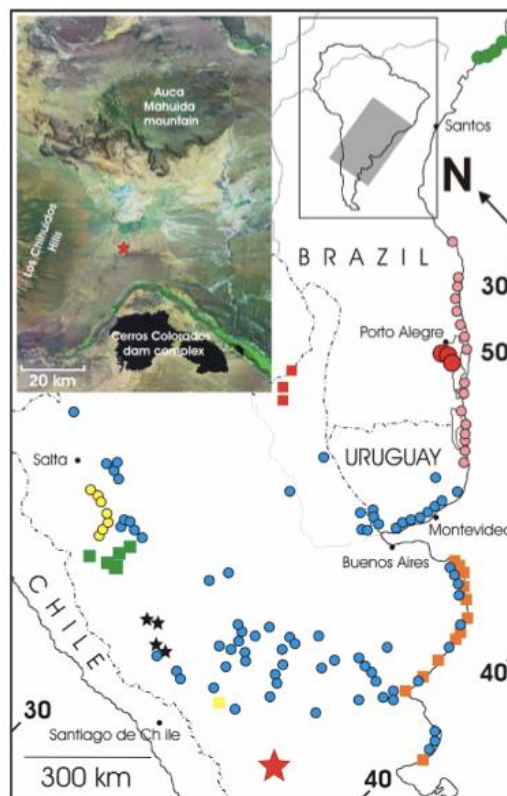
- *Liolaemus rabinoi* (CEI, 1974): encontrado na província de Mendoza, Departamento de San Rafael, Argentina (ETHERIDGE, 2000);

- *Liolaemus riojanus* CEI, 1979: de Rioja e San Juan, Argentina (ETHERIDGE, 2000);

- *Liolaemus salinicola* LAURENT, 1986: em Catamarca, Argentina (CEI, 1986);

- *Liolaemus scapularis* LAURENT, 1982: nas planícies áridas das Províncias de Catamarca e de Tucumán, Argentina (ETHERIDGE, 2000);

- *Liolaemus wiegmanni* (DUMÉRIL & BIBRÓN, 1837): com uma ampla distribuição na Argentina (CEI, 1986) e Uruguai (GUDYNAS, 1981a, b, c).



**Figura 1** – Distribuição conhecida das espécies do grupo “*wiegmannii*”. Quadrados vermelhos, *L. azarai*; quadrados laranjas, *L. multimaculatus*; quadrados verdes, *L. salinicola*; círculos verdes, *L. lutzae*; círculos amarelos, *L. scapularis*; círculos vermelhos, *L. arambarensis*; círculos rosas, *L. occipitalis*; círculos azuis, *L. wiegmanni*; estrelas pretas, *L. riojanus*; quadrado amarelo, *L. rabinoi*; estrela vermelha, *L. cuyumhue*.

Fonte: AVILA *et al.* 2009

*Liolaemus arambarensis* (Figura 2) é um lagarto de areia de tamanho reduzido, natural dos ambientes de restingas da Laguna dos Patos e endêmico

destes locais. A sua distribuição conhecida até o momento é desde o município de Viamão até São Lourenço. Exibe uma coloração críptica com o ambiente, confundindo-se com o substrato onde vive. Basicamente se alimenta de insetos, aranhas e matéria vegetal. A sua reprodução é ovípara entre os meses de agosto e março (VERRASTRO *et al.* 2003). Esta espécie foi registrada por Peters; Donoso-Barros (1970) e citada por Lema (1994), como sendo *Liolaemus wiegmannii*. Esta determinação foi revisada, pois se constataram diferenças morfológicas marcantes, resultando na descrição de uma nova espécie para o Rio Grande do Sul (VERRASTRO *et al.* 2003).



**Figura 2** – Exemplo de *Liolaemus arambarensis* sobre o substrato de seu habitat natural (Foto: M. B. Martins).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi obtido de amostras tombadas na Coleção Científica do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram amplificados os fragmentos do DNA nuclear utilizando-se os *primers*KIF24, PRLR e Selt, para quatro indivíduos das espécies *L. arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmanni*, e um indivíduo das espécies *L. lutzae*, *L. salinicola*, *L. scapularis* e *L. multimaculatus*. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% com DNA corado com 1µl de GelRed em 1mL de BFB 10%. Após, foram purificados enzimaticamente com exonuclease I e *shrimp alkaline phosphatase* (ExoSAP) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). Para marcadores do mtDNA (COI e CytB), foram utilizados os dados gerados por Caroline M. Silva (PPG Biologia Animal, UFRGS) (SILVA, 2013).

Os cromatogramas foram conferidos visualmente, e as sequências consenso foram exportadas para cada indivíduo utilizando-se o programa Genious (disponível em [www.geneious.com](http://www.geneious.com)). As sequências foram alinhadas e editadas no programa BioEdit (HALL, 1999), que também foi usado para concatenar as mesmas.

A árvore para o mtDNA, para cada loco nuclear, para os dados concatenados e para os genes nucleares concatenados foram estimadas a partir de duas abordagens: Inferência Bayesiana, no programa BEAST 1.7.3 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007) e Máxima Verossimilhança (MV), no programa GARLI 2.0 (ZWICKL, 2006). É importante comentar que enquanto o programa BEAST assume algum tipo de relógio molecular, a estimativa de MV é totalmente livre desse pressuposto. Os modelos evolutivos utilizados foram aqueles sugeridos pelo programa jModeltest (POSADA, 2008). Na abordagem de concatenação, a topologia de árvore estimada para o conjunto de genes concatenados foi considerada como a topologia da árvore de espécies. Para a estimativa de árvore de espécie sob o modelo coalescente, foi utilizado o modelo Bayesiano implementado no módulo \*Beast (HELED; DRUMMOND, 2010), executado no programa BEAST 1.7.3 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007), o qual considera a história de cada gene individualmente como parte de uma árvore de espécie comum a todos.

Para a análise de MV, foram utilizados os valores padrão de busca com três replicações para garantir a convergência das análises. O valor de suporte para cada

clado foi obtido com 1000 replicações de *bootstrap*. Já na análise Bayesiana, as árvores de gene foram estimadas através do prior Yule, com 50 milhões de gerações amostradas a cada 1000 gerações, e um *burnin* de 10%. A árvore de espécies coalescente foi estimada através de um prior Yule para a árvore de espécies e um prior populacional linear para cada população ancestral, que permite que as discordâncias entre árvores de genes sejam modeladas em um processo coalescente. Foram feitas 100 milhões de gerações amostrando a cada 1000 gerações e um *burnin* de 10%. Para calibrar relógio molecular foi utilizada uma taxa de substituição do CytB com distribuição normal com média de  $2,23 \times 10^{-2}$  por sítio por milhão de anos, e desvio padrão de  $0,5 \times 10^{-2}$  por sítio por milhão de anos (FONTANELLA *et al.*, 2012). Além desse, para todos os genes foi definido um prior para a raiz tendo *L. darwinii* como grupo externo usando distribuição normal com média de 12,5 milhões de anos (Ma) e desvio padrão de 2,25 Ma (FONTANELLA *et al.*, 2012), restringindo um intervalo de uniforme de taxas entre  $1 \times 10^{-2}$  e  $5 \times 10^{-5}$  por sítio por milhão de anos para os marcadores autossômicos e entre  $5 \times 10^{-2}$  e  $5 \times 10^{-3}$  para o gene mitocondrial COI. Todas as análises foram feitas assumindo relógio estrito. A coleção posterior de árvores foram sumarizadas como árvore consenso contendo os clados de máxima credibilidade no Tree Annotator (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007) descartando as 2001 primeiras árvores amostradas como *burnin*, equivalentes aos 10% iniciais da análise.

## 4 RESULTADOS

O conjunto de dados alinhados consistiu em 3006 pares de base para 5 genes para os 13 taxa. Os modelos de substituição adotados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Marcadores moleculares utilizados no estudo ranqueados por porcentagem de variação.

Loco	Tipo de marcador	Modelo de substituição	Extensão (bp)	Varição (%)
CytB	mtDNA	HKY + G	785	29,2
COI	mtDNA	HKY + G	617	26,6
KIF24	Autossômico	HKY + G	526	6,8
PRLR	Autossômico	HKY	543	6,4
Selt	Autossômico	HKY	535	5,0

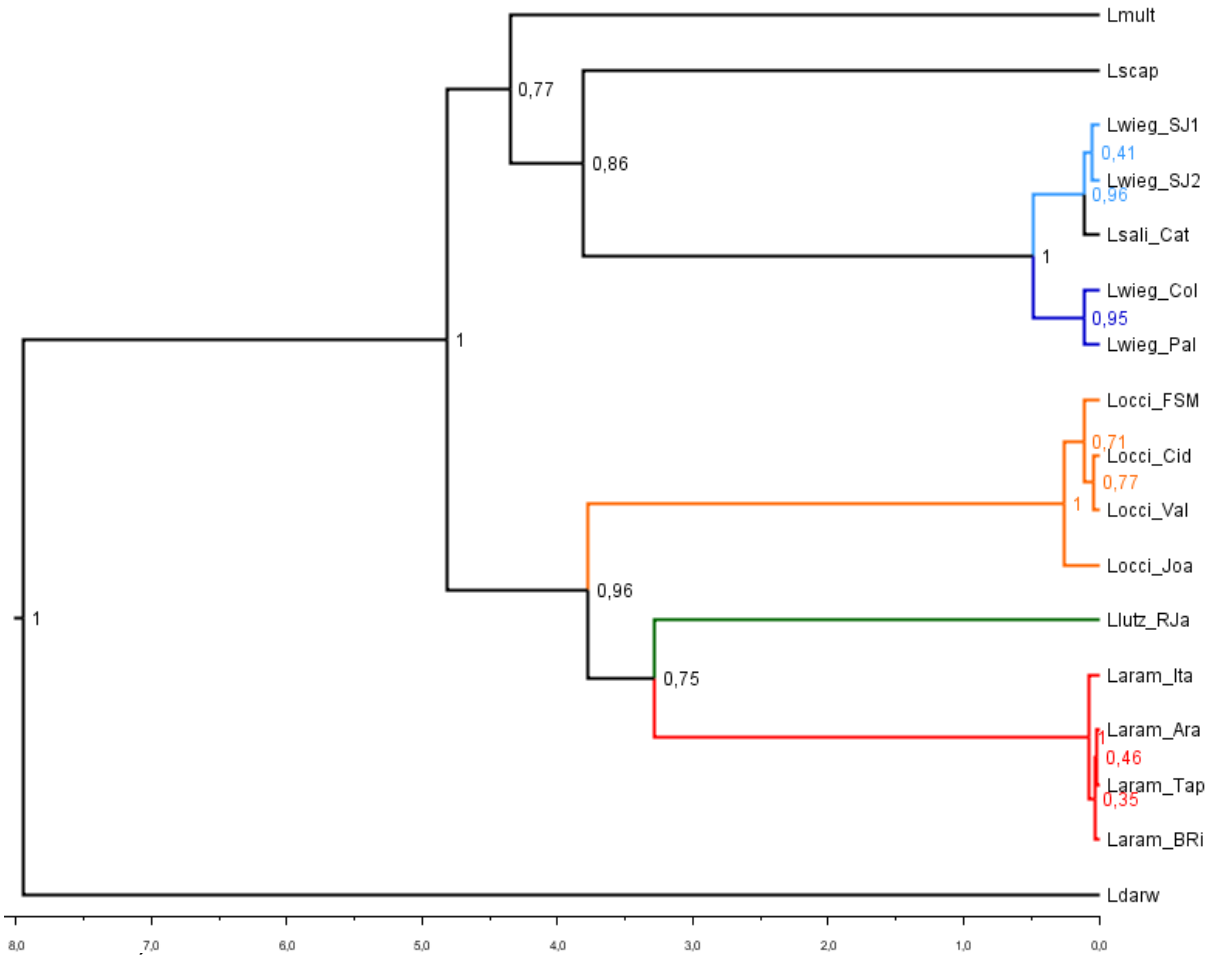
Fonte: a autora, 2013.

Todas as árvores geradas nas análises estão representadas das Figura 3 a 16. Com exceção da árvore do mtDNA (Figura 5), a relação irmã de *L. arambarensis* e *L. lutzae* é sugerida em todas as filogenias. Apesar da árvore de espécies coalescente (Figura 3) e de algumas das árvores de gene nucleares (PRLR e Selt) apresentarem baixo suporte para esse clado na análise de MV (Figuras 15 e 16), todas as outras árvores sugerem um clado bem suportado. O clado (*L. occipitalis*, *L. arambarensis*, *L. lutzae*) é suportado pela filogenia mitocondrial (Figura 5) e pelas árvores de espécies com e sem concatenação dos dados (Figuras 3 e 4), embora isso não tenha ocorrido na abordagem por MV (Figuras 11 e 12).

A relação próxima entre *L. salinicola* e *L. wiegmanni* é bem suportada pela maioria das análises, exceto pela árvore do gene nuclear PRLR usando MV, onde esse clado apresenta baixo suporte (Figura 12). Além disso, a separação entre os espécimes de *L. wiegmanni* da Argentina (*L. wiegmanni*-ARG) dos espécimes de *L. wiegmanni* do Uruguai (*L. wiegmanni*-UY) é bem suportada pelas árvores de gene do mtDNA (Figuras 5 e 12) e do nuclear PRLR (Figuras 7 e 12), bem como pelas árvores de espécies coalescente (Figura 3) e concatenada considerando a abordagem Bayesiana (Figura 4).

As árvores de espécie Bayesiana e de MV com dados concatenados apresentaram os valores de suporte mais altos do estudo (Figuras 4 e 11). Notavelmente, a árvore de espécie Bayesiana baseada nos dados concatenados

apresenta todos os clados como bem suportados. Embora não tenha havido discordância topológica entre a árvore concatenada em comparação com a árvore coalescente, os valores de suporte foram maiores na abordagem concatenada.



**Figura 3** - Árvore de espécie coalescente (\*Beast). O eixo X representa o tempo em milhões de anos. Ramo azul claro, *L. wiegmanni*-ARG; azul escuro, *L. wiegmanni*-UY; laranja, *L. occipitalis*; verde, *L. lutzae*; vermelho, *L. arambarensis*. O valores nos nós correspondem a probabilidade posterior do clado.

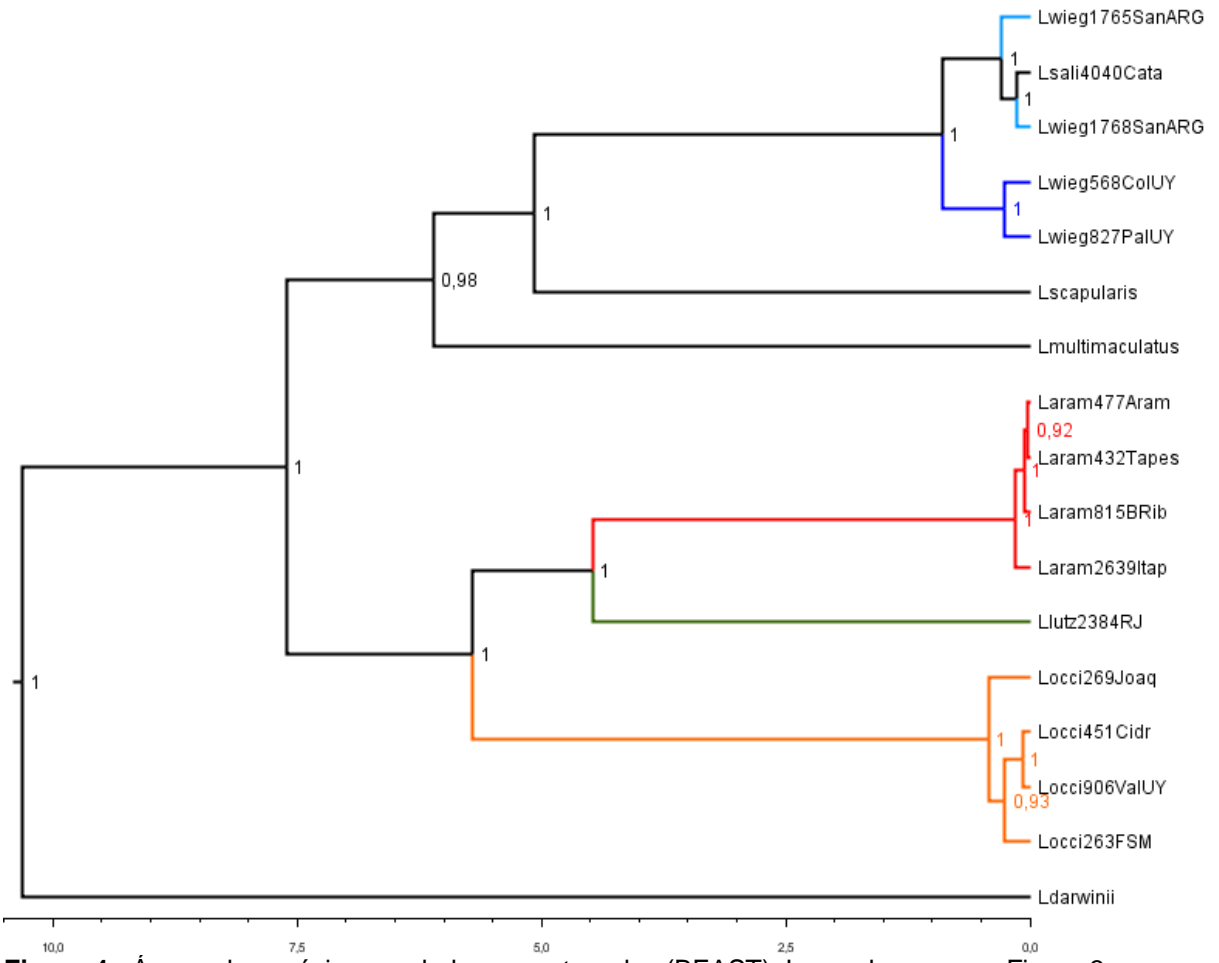
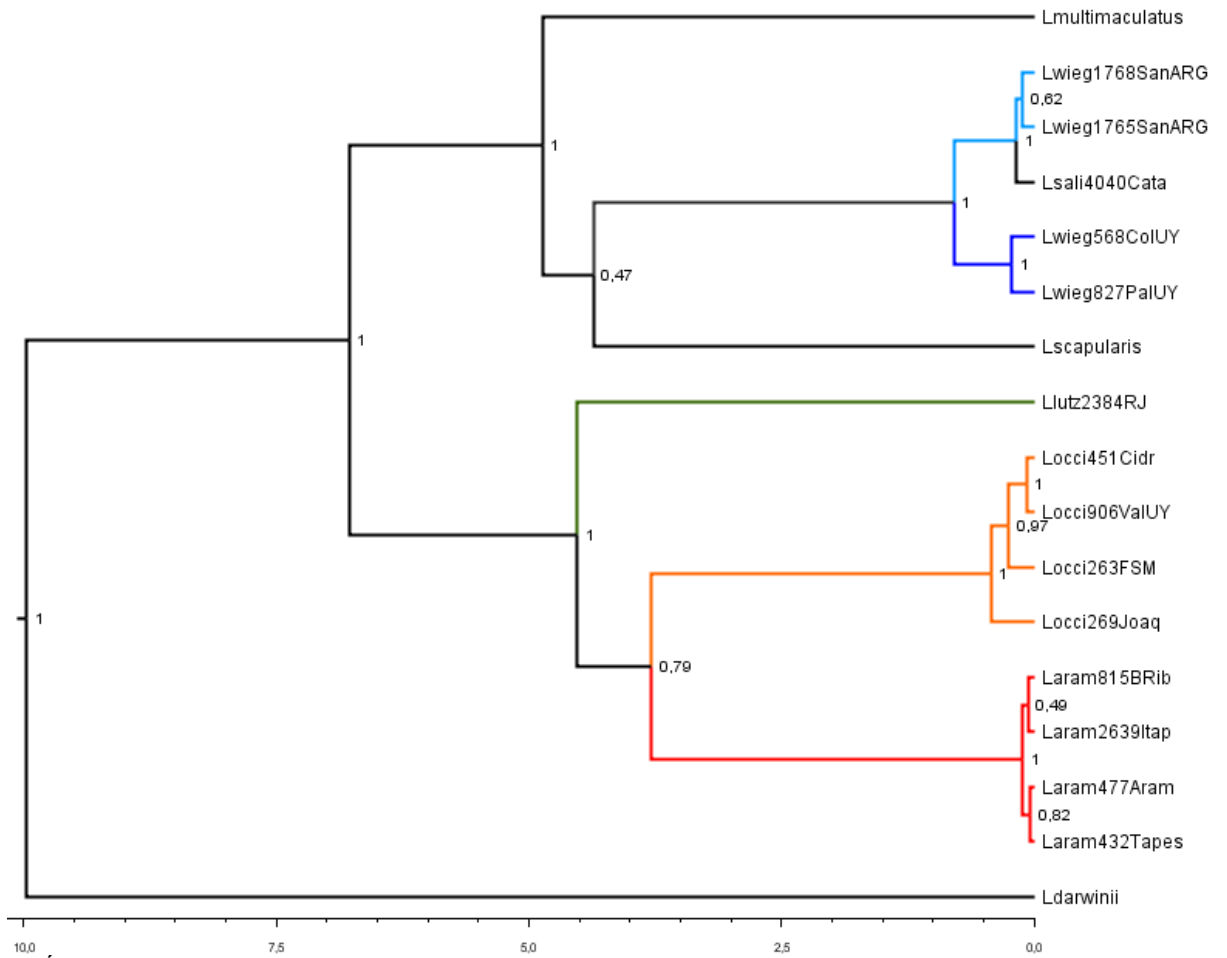


Figura 4 - Árvore de espécie com dados concatenados (BEAST). Legenda como na Figura 3.



**Figura 5** - Árvore de gene para o mtDNA (BEAST). Legenda como na Figura 3.

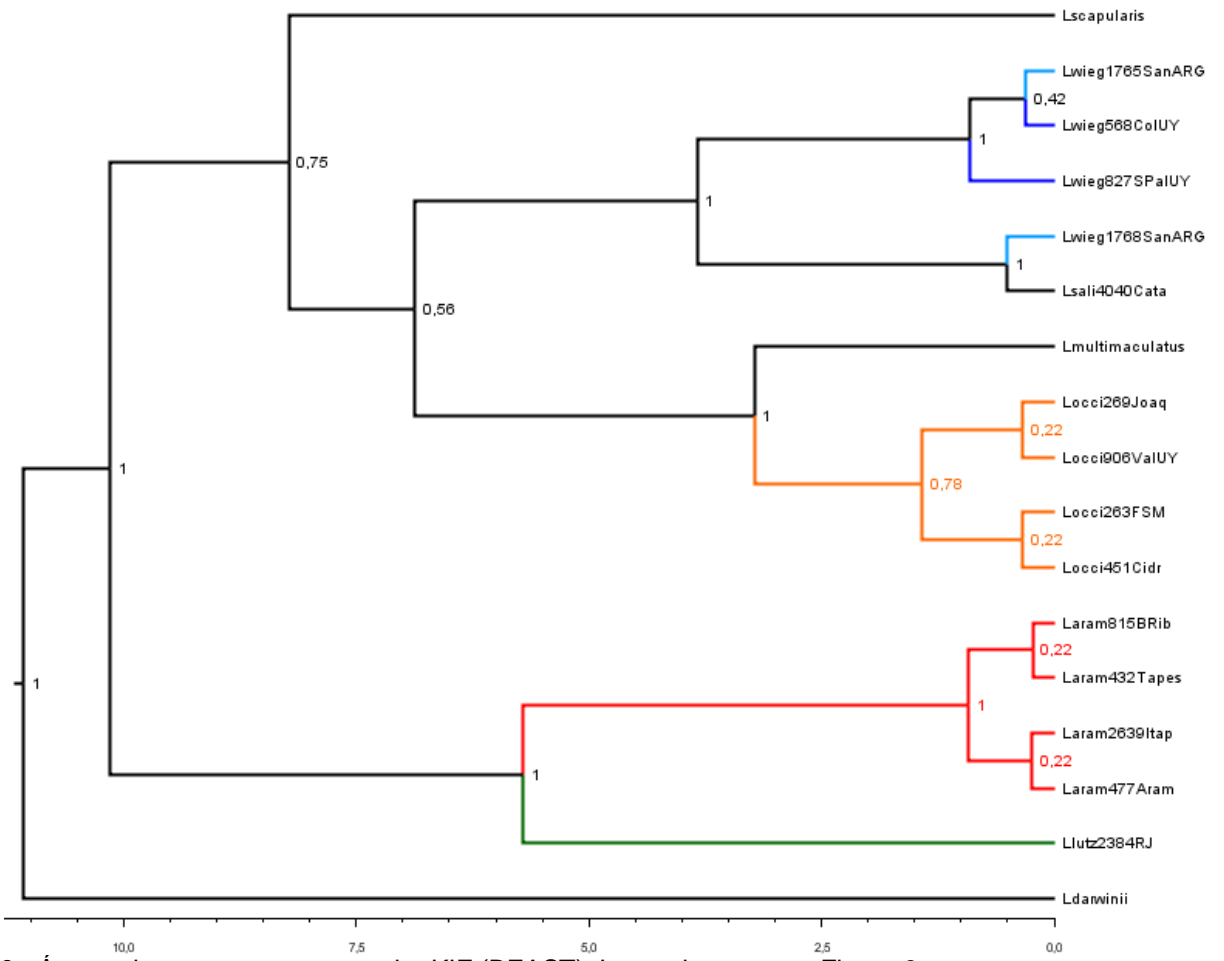
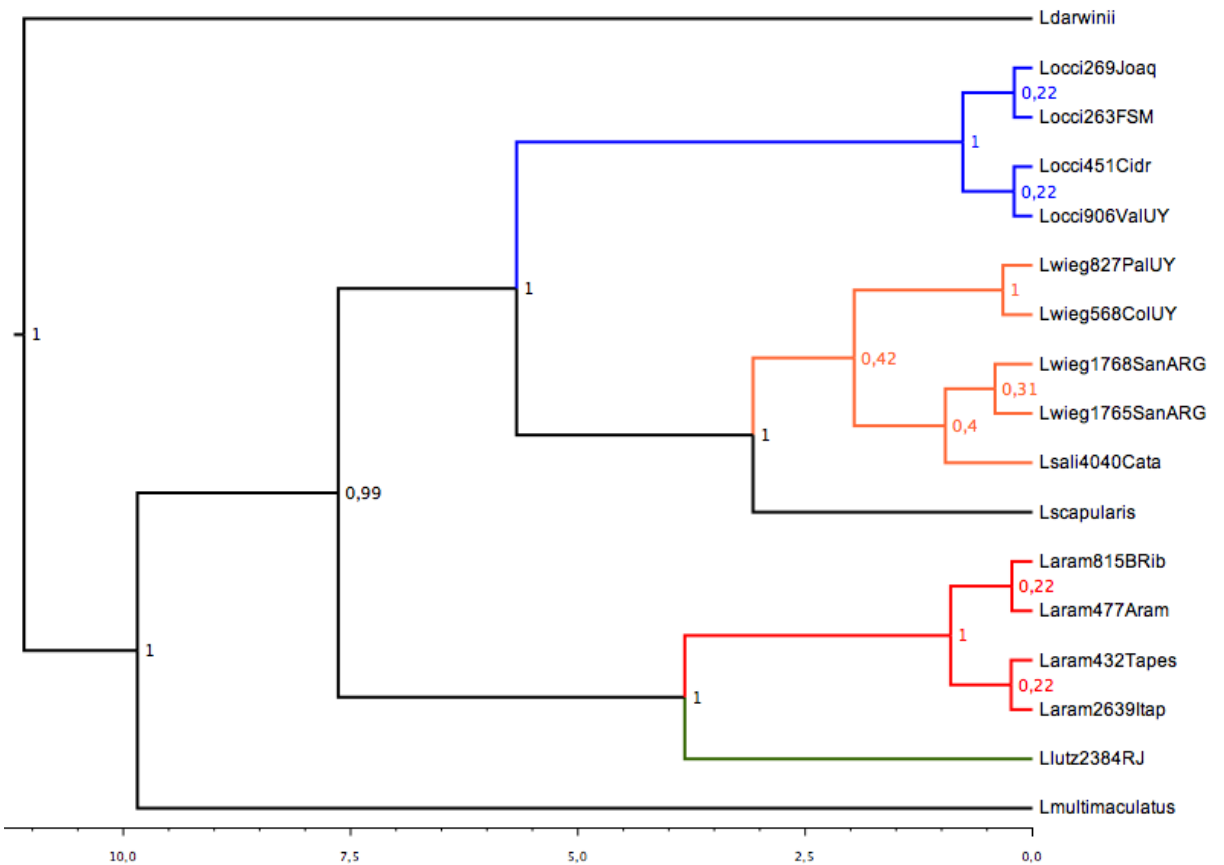
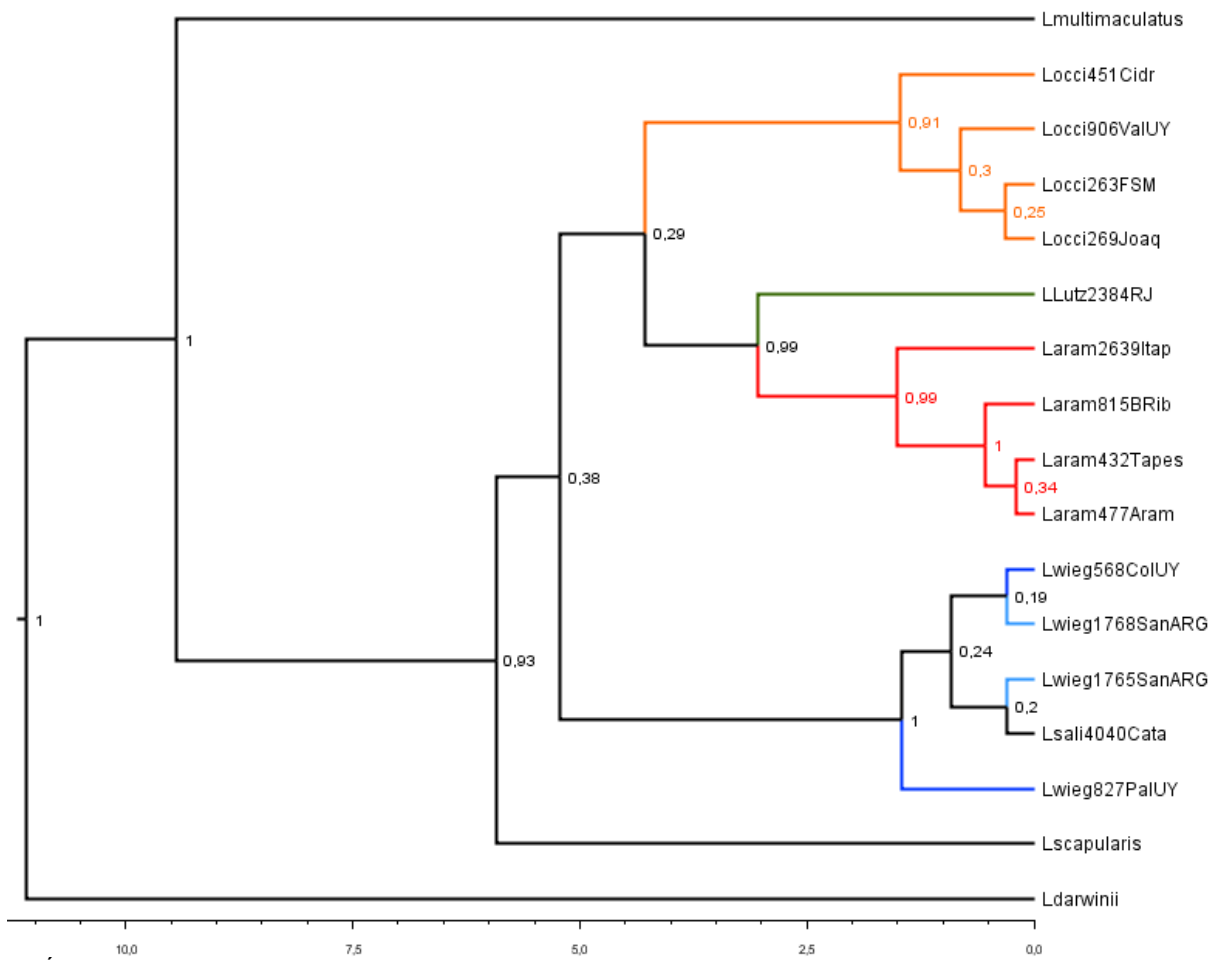


Figura 6 - Árvore de gene para o marcador KIF (BEAST). Legenda como na Figura 3.

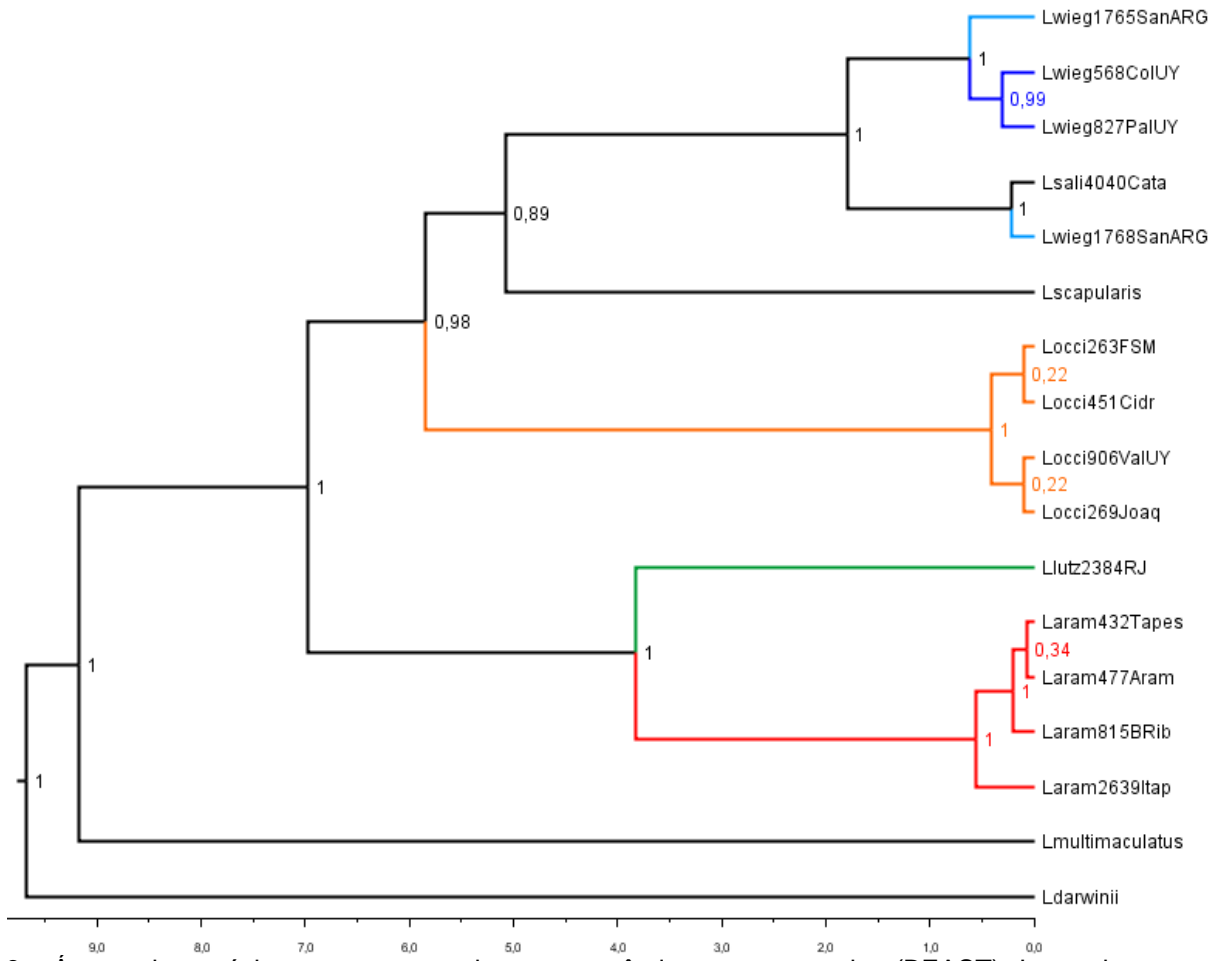


**Figura 7** - Árvore de gene para o marcador PRLR (BEAST). Legenda como na Figura 3.

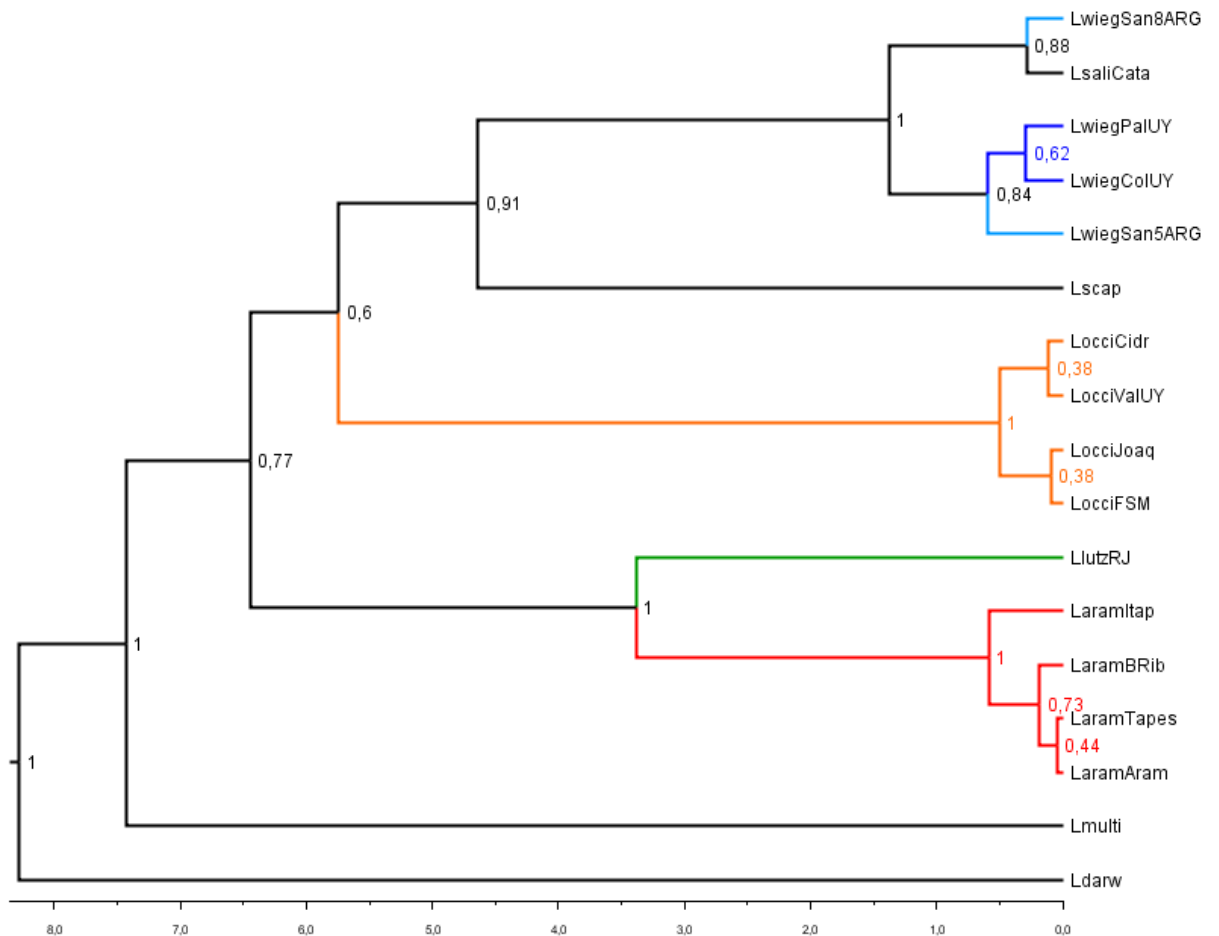


**Figura 8** - Árvore de gene para o marcador Selt (BEST). Legenda como na Figura 3.

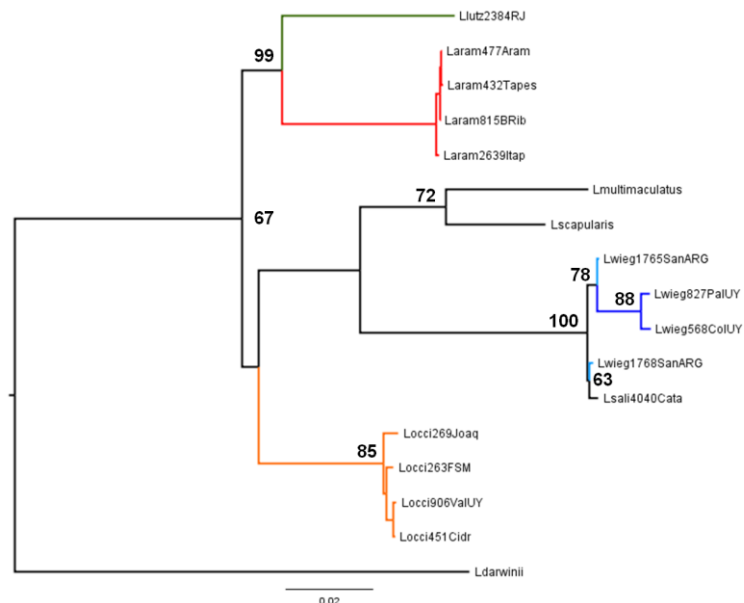




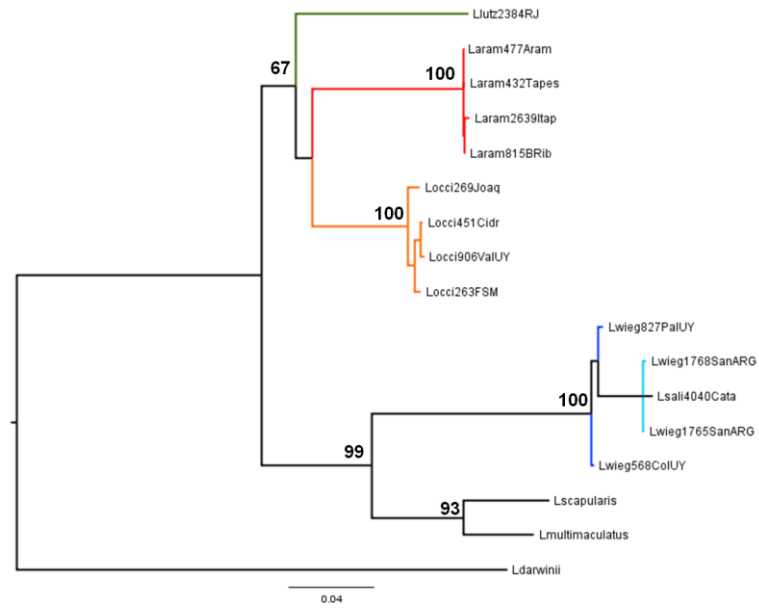
**Figura 9** - Árvore de espécie para os marcadores autossômicos concatenados (BEAST). Legenda como na Figura 3.



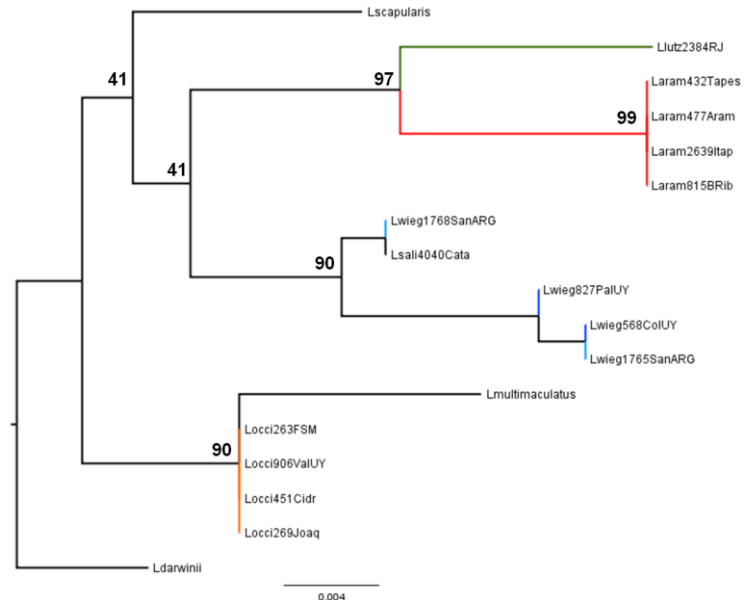
**Figura 10** - Árvore de espécie coalescente para os marcadores autossômicos (\*Beast). Legenda como na Figura 3.



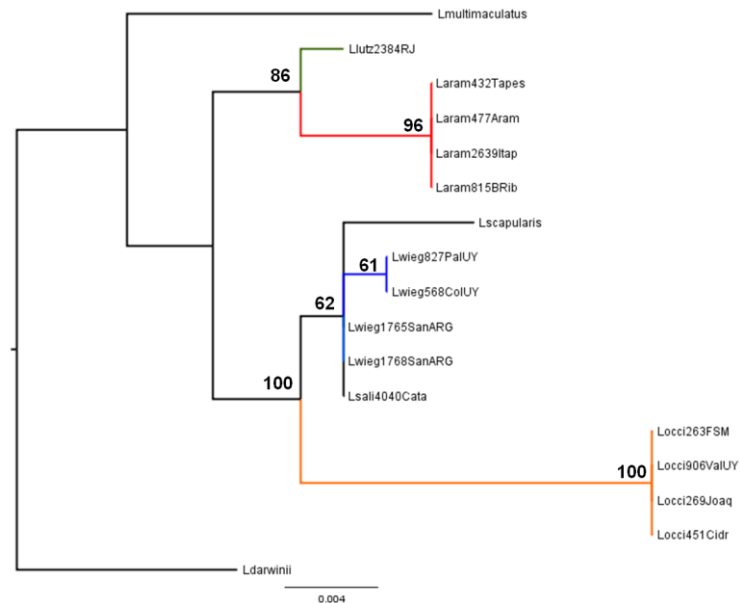
**Figura11** - Árvore de espécie com dados concatenados (MV). Ramo azul claro, *L. wiegmannii*-ARG; azul escuro, *L. wiegmannii*-UY; laranja, *L. occipitalis*; verde, *L. lutzae*; vermelho, *L. arambarensis*. O valores nos nós correspondem a probabilidade posterior do clado. Os número nos nós correspondem aos valores de *bootstrap* (%).



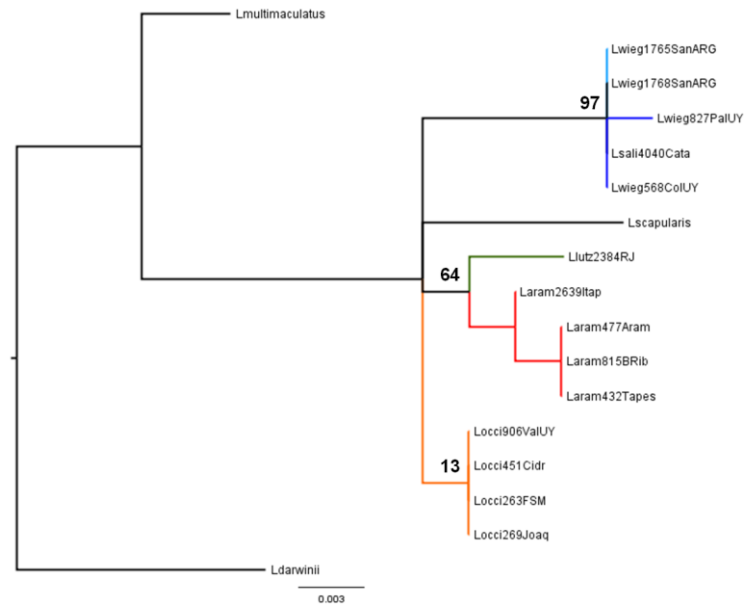
**Figura 12** - Árvore de gene para o mtDNA (MV). Legenda como na Figura 11.



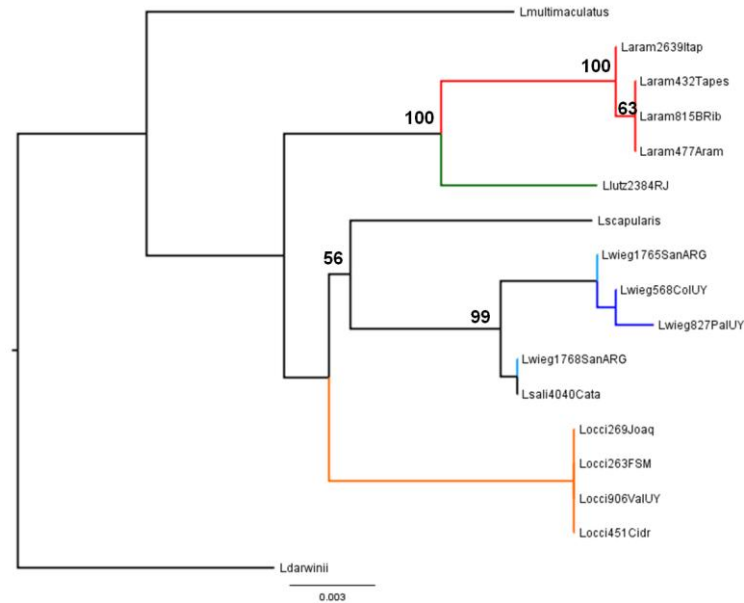
**Figura 13** - Árvore de gene para o marcador KIF (MV). Legenda como na Figura 11.



**Figura 14** - Árvore de gene para o marcador PRLR (MV). Legenda como na Figura 11.

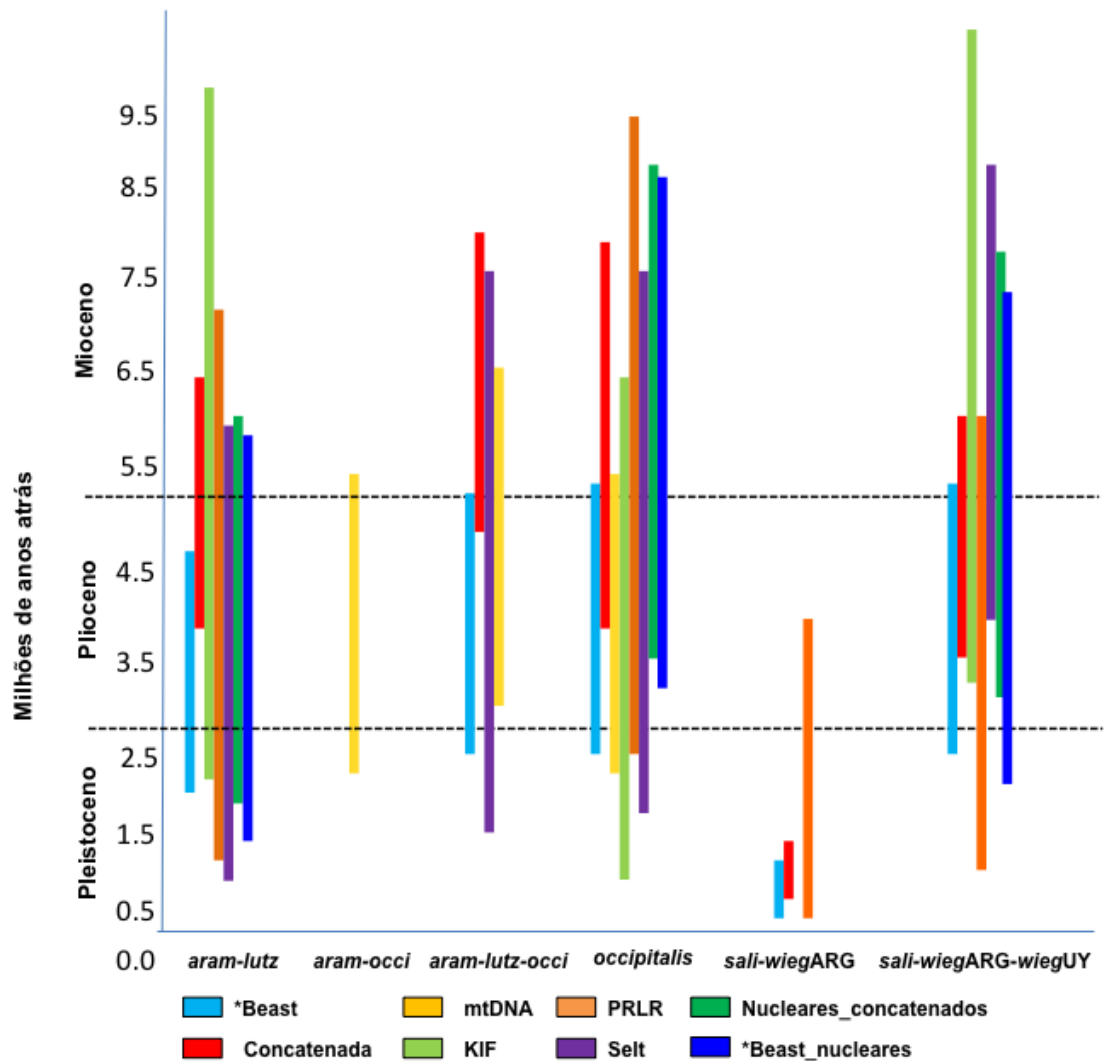


**Figura 15** - Árvore de gene para o marcador Selt (MV). Legenda como na Figura 11.



**Figura 16** - Árvore de espécie para os marcadores autossômicos concatenados (MV). Legenda como na Figura 11.

Os intervalos de confiança dos tempos de divergência dos principais clados de interesse estão apresentados na Figura 17 e Tabela 2. A maioria das datas para o surgimento dos clados (*L. arambarensis*, *L. lutzae*), (*L. arambarensis*, *L. occipitalis*), (*L. arambarensis*, *L. lutzae*, *L. occipitalis*), (*L. occipitalis*) e (*L. salinicola*, *L. wiegmannii*-ARG, *L. wiegmannii*-UY) indicam alguma data dentro do período Plioceno (~5,3 - 2,6Ma), enquanto para o clado (*L. salinicola*, *L. wiegmannii*-ARG), é indicada alguma data no período Pleistoceno (~2,3 Ma – 0,0115 Ma).



**Figura 17** - Intervalos de confiança dos principais clados de interesse. O eixo y representa o tempo em milhões de anos (Ma), no eixo x estão indicados os principais clados de interesse conforme discutidos no texto.

**Tabela 2** – Intervalos de confiança dos principais clados de interesse em milhões de anos.

Análise	( <i>aram-lutz</i> )	( <i>aram-occi</i> )	( <i>aram-lutz-occi</i> )	( <i>occipitalis</i> )	( <i>sali-wiegARG</i> )	( <i>sali-wiegARG-wiegUY</i> )
*Beast	1,96-4,77 (3,28)	x	2,54-5,24 (3,77)	2,54-5,24 (3,77)	0,12-0,84 (0,48)	2,49-5,34 (3,81)
Concatenada	3,06-6,24 (4,48)	x	3,98-7,94 (5,71)	3,98-7,94 (5,71)	0,56-1,35 (0,9)	3,54-7,03 (5,07)
mtDNA	x	2,45-5,45 (3,78)	2,99-6,44 (4,52)	2,45-5,45 (3,78)	3,22-6,8 (0,79)	0,46-1,21 (4,36)
KIF	2,39-9,84 (5,71)	x	x	0,91-6,34 (3,22)	x	3,3-11 (6,87)
PRLR	1,23-7,25 (3,82)	x	x	2,59-9,41 (5,67)	0,37-4,17 (1,96)	0,95-5,96 (3,07)
Selt	0,9-5,78 (3,04)	x	1,68-7,54 (4,28)	1,68-7,54 (4,28)	x	2,11-8,75 (5,22)
nucl_conc	2,05-6,05 (3,82)	x	x	3,57-8,63 (5,84)	x	3,07-7,66 (5,8)
nucl_*Beast	1,42-5,9 (3,38)	x	x	3,38-8,58 (5,74)	x	2,28-7,25 (4,64)

Nota: entre parênteses encontram-se os valores da mediana.

## 5 DISCUSSÃO

O trabalho empregou múltiplos locos e várias abordagens metodológicas para reconstruir a relação filogenética e obter os tempos de divergência de *L. arambarensis*, e outras espécies proximamente relacionadas do grupo “*wiegmannii*”. Também foi feita uma comparação entre a abordagem que utiliza a concatenação dos dados em relação ao método que considera as árvores de gene separadamente, bem como entre métodos com e sem relógio molecular. Apesar de não terem sido utilizadas todas as onze espécies que constituem o grupo, esse fato provavelmente não interferiu para encontrar a posição filogenética da espécie de interesse, uma vez que todas as demais (*L. azarai*, *L. cuyumhue*, *L. rabinoi* e *L. riojanus*) possuem área de ocorrência na Argentina, e espera-se uma relação mais próxima entre espécies geograficamente relacionadas. No entanto, a incorporação dessas espécies em uma análise posterior é necessária para estabelecer sua relação filogenética com as espécies utilizadas neste estudo.

De forma geral, as análises realizadas neste estudo suportam a relação irmã de *L. arambarensis* com *L. lutzae*, que foi obtida tanto para a árvore de espécie coalescente (embora com baixo suporte) quanto para os genes concatenados. Da mesma forma, o clado (*L. lutzae*, *L. arambarensis*, *L. occipitalis*) foi recuperado com alto suporte. Ainda que a filogenia do mtDNA sugira o clado (*L. occipitalis*, *L. arambarensis*) com baixo suporte, esse agrupamento alternativo não é apoiado por nenhuma árvore de gene nuclear nem pelas árvores de espécie nucleares (seja a árvore de espécie coalescente, seja com genes concatenados). Essa é uma discrepância curiosa, uma vez que a teoria da coalescência sugere que uma maior discordância genealógica ocorra para genes autossômicos, cujo tamanho populacional efetivo é quatro vezes maior do que para o mtDNA.

Uma hipótese para explicar essa contradição, poderia envolver a introgressão do mtDNA entre *L. arambarensis* e *L. occipitalis* em algum momento do passado, uma vez que a hibridação também pode resultar em uma incogruência topológica entre uma árvore de gene e a árvore de espécies, embora esse processo não seja modelado explicitamente pela maioria dos métodos de árvore de espécie coalescentes (FUNCHS *et al.* 2013; HELED; DRUMMOND, 2010). Alguns estudos já demonstraram introgressão de linhagens ocorrendo entre diferentes espécies do

gênero *Liolaemus*. Morando *et al.* (2004) apresentaram evidências de introgressão entre o mtDNA de *L. darwini* em *L. laurenti* e *L. grosseorum*. Ainda, foram encontrados indícios de introgressão entre *L. bibronii* e *L. gracilis*, na mesma área de hipótese de introgressão de *L. darwini* (MORANDO *et al.* 2007), e uma possível zona híbrida entre *L. occipitalis* e *L. wiegmanni* no litoral uruguaio (SILVA, 2013). Contudo, deve-se ressaltar que a hibridização entre *L. arambarensis* e *L. occipitalis*, é apenas uma hipótese que não é diretamente suportada pelos dados aqui apresentados e cujo teste deverá envolver um número maior de genealogias independentes (isto é, um maior número de marcadores autossômicos). Um problema deste estudo para elucidar questões como essa, é o limitado número de marcadores utilizados. Além de fornecer estimativas filogenéticas mais acuradas, o uso de um maior número de locos produz uma estimativa mais robusta do tamanho populacional (FELSENSTEIN 2006), que é um parâmetro crítico para acomodar a discordância entre árvores de genes em relação à árvore de espécie no modelo de coalescência multiespécies (CASTILLO-RAMIREZ *et al.* 2010).

Segundo a árvore de espécie coalescente, o surgimento de *L. occipitalis* (3,77 Maa) *L. arambarensis* e *L. lutzae* (3,28 Maa) teria ocorrido durante o Plioceno. Interessantemente, a especiação de *L. occipitalis* é muito mais antiga do que a formação inicial da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS), perto de 400 kya (VILLWOCK; TOMAZELLI, 1995; TOMAZELLI; VILLWOCK, 2005). Isso sugere que *L. occipitalis* provavelmente desde muito tempo vem ocupando alguma antiga zona costeira, tendo ocupado a PCRS “moderna” apenas recentemente, quando essa área tornou-se disponível. Esse fato expressa o cuidado que os pesquisadores devem ter ao associar muito fortemente uma espécie a uma região geológica que ela ocupa no presente. Em relação às estimativas de datação, o surgimento das linhagens inferidas como irmãs, *L. arambarensis* e *L. lutzae*, teria ocorrido durante o Plioceno. Essa datação coincide com o período da elevação das montanhas brasileiras costeiras (SIMPSON, 1979) que levaram a alterações de umidade, causando subsequentes fragmentações da Mata Atlântica (VASCONCELOS *et al.*, 1992). Esse período parece ter sido uma época de diferenciação intensa para muitos grupos da América do Sul (i. e. CORTES-ORTIZ *et al.* 2003). Tais eventos podem ter sido importantes na separação de linhagens que acabaram especiando, como pode ser o caso em *Liolaemus*, ou na separação de grupos filogeográficos (GRAZZIOTIN *et al.* 2006). Estas conclusões, concordam com outros estudos, de que os processos



que deram origem a biodiversidade Neotropical são complexos (COSTA, 2003; GRAZZIOTIN *et al.* 2006) e que podem envolver preferencialmente processos muito mais antigos do que as glaciações associadas ao Quaternário.

Em relação à estrutura filogenética apresentada por *L. wiegmanni*, os dados sustentam uma divergência entre duas linhagens filogenéticas separadas pelo rio da Prata: *L. wiegmanni*-ARG e *L. wiegmanni*-UY. Ainda, *L. salinicola* e *L. wiegmanni*-ARG parecem ser uma unidade evolutiva muito relacionada, o que condiz com a suas áreas de ocorrência próximas. Essas relações, corroboram a ideia de estudos anteriores de que *L. wiegmanni* possa ser um complexo de espécies (AVILA, 2003; MORANDO, 2004; AVILA *et al.* 2006). Em termos de conservação, estudos futuros com *L. wiegmanni* podem ser importantes para caracterizar diferentes populações em diferentes unidades evolutivas que representem potenciais candidatos a espécies cuja distribuição, se restrita, pode implicar em um novo *status* de conservação para essas populações.

Para *L. wiegmanni*, a árvore coalescente indica a divergência dos dois subclados, argentino e uruguaio, durante o Pleistoceno (~480 kya). Estudos anteriores já apontaram a presença de rios como barreiras isolando as populações de espécies do gênero *Liolaemus*. Por exemplo, o rio Chico na Argentina foi apontado como uma antiga barreira para *L. lineomaculatus* (BRIETMAN *et al.* 2011). Para *L. monticola*, os rios Maipo, Yeso e Aconcagua no Chile, configuram as principais barreiras entre as populações da espécie (TORRES-PEREZ *et al.* 2007). Rinaldi *et al.* (2006) estudou as unidades geotécnicas ligadas a formação do estuário do Rio da Prata, e indicou uma formação continental (Barra Del Rio) e outra marinha (Puerto Olivos) ocorrendo durante o Pleistoceno. Para a formação Puerto Olivos se considera uma antiguidade entre 0,98 Ma e 1,76 Ma (revisado por POMI, 2008). Portanto, essa formação pode ter sido uma barreira importante na separação das linhagens argentina e uruguaia em *L. wiegmanni*, e ainda estudos ecológicos e morfológicos poderiam ser realizados para avaliar se essas linhagens evolutivas distintas poderiam constituir de fato em diferentes espécies.

As abordagens feitas neste estudo mostram a importância da comparação dos métodos utilizados na inferência filogenética. Embora as árvores de espécie coalescente e com dados concatenados tenham resultado na mesma topologia, os altos valores de suporte para a árvore com os dados concatenados pode representar uma falsa certeza sobre as relações interespecíficas (KUBATKO; DEGNAN,

2007). De maneira semelhante, Morando *et al.* 2012 realizou a inferência filogenética de lagartos de gênero *Phymaturus* utilizando três conjunto de dados: mtDNA concatenados, nucleares concatenados, e todos o genes em uma árvore de espécies. A análise concatenada recuperou clados altamente suportados, mas foram encontradas topologias discordantes da análise de todos os genes. Kubatko e Degnan (2007) em estudo de simulação, analisaram a abordagem de concatenação em condições em que a coalescência produz um alto nível de discordância entre as árvores de gene. Eles demonstraram que clados oriundos de filogenia incorretas podem ter um suporte entre moderado a alto em tais condições, e destacaram a importância de incorporar explicitamente a variação das histórias de gene nos estudos filogenéticos multilocos. No que se refere as abordagens Bayesiana e de MV, as árvores não tiveram diferenças significativas em suas topologias (i.e. clados bem suportados distintos para ambas as análises), mas de maneira geral, os valores de suporte da análise Bayesiana foram maiores do que os da análise de MV, o que é esperado dado o “conservadorismo” dos valores de bootstrap usados na análise de MV em relação aos valores de probabilidades a posteriori da abordagem Bayesiana (DOUADY *et al.*, 2003). De modo geral, o uso de diferentes métodos teve um impacto menor do que a utilização ou não de dados concatenados para o mesmo método (abordagem Bayesiana, no nosso caso).

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo sugere que as linhagens que deram origem às espécies brasileiras do gênero *Liolaemus* (*L. arambarensis*, *L. lutzae*, *L. occipitalis*), surgiram durante o Plioceno, o que pode estar relacionado ao soerguimento das montanhas costeiras brasileiras. Essa estimativa para *L. occipitalis* durante o Plioceno é muito mais antiga do que a região onde essa espécie ocorre atualmente, a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, indicando que a espécie só colonizou a região quando essa tornou-se disponível. Os resultados também sugerem que *L. arambarensis* seja espécie irmã de *L. lutzae*, embora essas espécies estejam atualmente distantes geograficamente. Além disso, é possível que a discrepância entre as árvores nucleares e do mtDNA reflitam uma zona híbrida no passado com introgressão de linhagens mitocondriais entre populações ancestrais de *L. occipitalis* e *L. arambarensis*. Para *L. wiegmannii*, os subclados uruguaio e argentino, hoje separados pelo Rio da Prata, podem representar diferentes espécies ou linhagens isoladas que poderiam estar sofrendo algum processo de especiação incipiente. Esses resultados podem ajudar na compreensão dos processos que afetam o tempo e modo da diversificação entre espécies que ocorrem no sul do Brasil, Argentina e Uruguai.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, C. S.; QUINTEROS, S.; ESPINOZA, R.E. Two new species of *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) from the Puna of northwestern Argentina. **Herpetologica**, Lafayette, LA, v. 64, n. 4, p. 458-471, 2008.

ÁVILA, L. J MORANDO, M., SITES JR, J. W. Inferring evolutionary processes in “inertial species” – an example in Patagonian lizards of the *Liolaemus fitzingerii* complex (Squamata: Liolaemidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.89, n. 2, p. 241–275, 2006.

ÁVILA, L. J.; MORANDO, M.; PEREZ, C. H. F.; SITES JR, J. W. A new species of *Liolaemus* from Añelo sand dunes, northern Patagonia, Neuquén, Argentina, and molecular phylogenetic relationships of the *Liolaemus wiegmannii* species group (Squamata, Iguania, Liolaemini). **Zootaxa**, Auckland, n.2234, p. 39–55, 2009.

ÁVILA, L. J.; PEREZ, C. H. F., MORANDO, M., SITES JR, J. W. A new species of *Liolaemus* (Reptilia: Squamata) from southwestern Rio Negro province, northern Patagonia, Argentina. **Zootaxa**, Auckland, n. 2434, p.47–59, 2010a.

ÁVILA, L. J.; PEREZ, C. H. F., MORANDO, M., SITES JR, J. W. A new species of the *Liolaemus elongates* clade (Reptilia: Iguania: Liolaemini) from Cordillera del Viento, northwestern Patagonia, Neuquén, Argentina. **Zootaxa**, Auckland, n. 2667, p. 28–42, 2010b.

ÁVILA, L. J.; PEREZ, C. H. F.; MORANDO, M. A new species of *Liolaemus* (Argentina). **Herpetologica**, Lafayette, LA, v.59, n. 4, p. 532–543, 2003.

BREITMAN M. F., ÁVILA L. J., SITES JR J. W., MORANDO M. Lizards from the end of the world: phylogenetic relationships of the *Liolaemus lineomaculatus* section (Squamata: Iguania: Liolaemini). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 59, n. 2, p. 364–376, 2011.

BRITO, P. H.; EDWARDS S. V. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. **Genetica**, Dordrecht, v. 135. n. 3, p. 439-455, 2009.

BROMHAM, L.; PENNY, D. The modern molecular clock. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 3, p. 216-224, 2003.

CASTILLO-RAMÍREZ, S.; LIU, L.; PEARL, D.; EDWARDS, S. V. Bayesian estimation

of species trees: a practical guide to optimal sampling and analysis. In: KNOWLES, L. L.; KUBATKO, L. S. **Estimating species trees: practical and theoretical aspects**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p. 15-33.

CEI, J.M. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. **Monografie/Museo Regionale di Scienze Naturali**, Torino, n. 4, p. 1-527, 1986.

CORTÉS-ORTIZ, L.; BERMINGHAM, E.; RICO, C. *et al.* Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 26, n. 1, p. 64–81, 2003.

COSTA, L. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 71– 86, 2003.

DEGNAN, J. H.; SALTER, L. A. Gene tree distributions under the coalescent process. **Evolution**, Lawrence, Kan, n. 1, v. 59, p. 24–37, 2005.

DEGNAN, J. H.; ROSENBERG, N. A. Discordance of species trees with their most likely gene trees. **PLOS Genetics**, v. 2, n. 5, p. 762-768, 2006.

DEGNAN, J. H.; ROSENBERG, N. A. Gene discordance tree, phylogenetic inference and multispecies coalescent. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 332-340, 2009.

DONOSO-BARROS, R. **Reptiles del Chile**. Santiago: Universidad de Chile, 1966.

DOUADY, C. J.; DELSUC, F.; BOUCHER, Y.; DOOLITTLE, W. F.; DOUZERY, E. J. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 2, p. 248-254, 2003.

DRUMMOND, A. J.; ALEXEI, J.; HO, S. Y. W.; PHILLIPS, M. J. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLOS Biology**, v. 4, n. 5, p. 699-710, 2006.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 34, n. 7, 2007.

EDWARDS, S. V.; LIU, L.; PEARL, D. K. High-resolution species trees without concatenation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, US, v. 104, n.14, p. 5936–5941, 2007.

ETHERDIGE, R. A review of lizards of the *Liolaemus wiegmanni* group (Squamata, Iguania, Tropicuridae), and a history of morphological change in the sand-dwelling species. **Herpetological Monographs**, Washington, US, n. 14, p. 293-352, 2000.

ETHERDIGE, R. Redescription of *Ctenoblepharys adspersa* Tschudi, 1845, and the taxonomy of Liolaeminae (Reptilia: Squamata: Tropicuridae). **American Museum Novitates**, New York, v. 3142, p. 1-34, 1995.

ETHERIDGE R., ESPINOZA R. E. Taxonomy of the Liolaeminae (Squamata: Iguania: Tropicuridae) and a semi-annotated bibliography. **Smithsonian Herpetological Information Service**, Washington, US, v. 26, p. 1–64, 2000.

FELSENTEIN, J. Accuracy of coalescent likelihood estimates: Do we need more sites, more sequences, or more loci? **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 23, n. 3, p. 691–700, 2006.

FELSENTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. Sunderland: Sinauer, 2005.

FONTANELLA, M. F. *et al.* Molecular dating and diversification of the South American lizard genus *Liolaemus* (subgenus *Eulaemus*) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v. 164, n. 4, p. 825-835, 2012.

FUNCHS, J.; PONS, J. M.; LIU, L. *et al.* A multi-locus phylogeny suggests an ancient hybridization event between *Campephilus* and melanerpine woodpeckers (Aves: Picidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 67, n. 3, p. 578-588, 2013.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 13, p. 3969-3982, 2006.

GUDYNAS, E. Consideraciones sobre la Herpetofauna del Uruguay y áreas vecinas con una aproximación biogeográfica. *In*: **Jornadas de Ciencias Naturales, Centro Educativo Don Orione**, Montevideo, v. 2, p. 5-6, 1981a.

GUDYNAS, E. Comentarios sobre biotopos, habitats, herpetofauna y la biogeografía del Uruguay y áreas vecinas. *In: Jornadas de Ciencias Naturales, Centro Educativo Don Orione*, Montevideo, v. 2, p. 7-8, 1981b.

GUDYNAS, E. New departmental records of *Liolaemus wiegmanni* from Uruguay. **Herpetological Review**, Lawrence, Kan, v. 12, n. 3. p. 84, 1981c.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nuclear Acids Symposium Series**, n.41, p. 95-98, 1999.

HALLOY, M.; ETHERIDGE, R.; BURGHARDT, G. M. To bury in sand: phylogenetic relationships among lizard species of the boulengeri group, *Liolaemus* (Reptilia: Squamata: Tropiduridae), based on behavioral characters. **Herpetological Monographs**, Washington, US, n. 12, p.1– 37, 1998.

HELED J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 27, n. 3, p. 570-580, 2010.

HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; MORTIZ, C. Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. In HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; MORTIZ, C. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer, 1996. p. 515–43.

KUBATKO, L. S.; DEGNAN, J. H. Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. **Systematic Biology**, Washington, US, v. 56, n. 1, p. 17-24, 2007.

LAURENT, R. F. Contribución al conocimiento de la estructura taxonómica del género *Liolaemus* Wiegmann (Iguanidae). **Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina**, Buenos Aires, v. 1, n. 6, p. 15-18, 1983.

LAURENT, R. F. On some iguanid genera related to or previously confused with *Liolaemus* Wiegmann. **Journal of Herpetology**, Athens, OH, v. 18, n. 4, p. 357-373, 1984.

LEMA, T. Lista comentada dos répteis ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 7, p. 41-150, 1994.

LIU, L.; PEARL, D.K. Species trees from gene trees: reconstructing Bayesian posterior distributions of a species phylogeny using estimated gene tree distributions. **Systematic Biology**, Washington, US, v. 56, n. 3, p. 504–514, 2007.

LIU, L.; YU L.; KUBATKO L. *et al.* Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 53, p. 320-328. 2009.

MACEY, J. R.; J. A. SCHULTE II, N. B.; ANANJEVA, A.; *et al.* 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**, Orlando, v. 10, n. 1, p. 118–131, 1998.

MORANDO, M.; AVILA, L. J.; BAKER, J.; SITES JR, J. W. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. **Evolution**, v.58, n. 4, p. 842–861, 2004.

MORANDO, M.; AVILA, L. J.; PEREZ, C. H. F.; HAWKINS, M. A.; SITES JR, J. W. A molecular phylogeny of the lizard genus *Phymaturus* (Squamata, Liolaemini): Implications for species diversity and historical biogeography of southern South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 66, n. 3, p. 694-714, 2013.

MORANDO, M.; AVILA, L. J.; SITES JR, J. W. Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus–kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean–Patagonian South America. **Systematic Biology**, Washington, US, v. 52, n. 2, p. 159–185, 2003.

MORANDO, M.; AVILA, L. J.; TURNER, C. R.; SITES JR, J. W. Molecular evidence for a species complex in the patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.43, n. 3, p. 952–973, 2007

PETERS, J. A.; OREJAS-MIRANDA, B.; VANZOLINI, P. E. Part II - Lizards and Amphisbaenians. In PETERS, J. A. **Catalogue of the Neotropical Squamata (Revised Edition)**. Washington, US: Smithsonian Institution Press., 1986.

PINCHEIRA-DONOSO, D.; SCOLARO, J. A.; SURE, P. A monographic catalogue on the systematics and phylogeny of the South American iguanian lizard family Liolaemidae (Squamata, Iguania). **Zootaxa**, Auckland, n. 1800, p. 1-85, 2008



POMI, L. H. Una nueva asociación de vertebrados fósiles de Edad Ensenadense (Plioceno tardío-Pleistoceno medio) de la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Ameghiniana**, Buenos Aires, v. 45, n. 2, p. 503-510, 2008.

POSADA, D. ModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.25n. 7, p.1253–1256, 2008.

RANNALA B.; YANG Z. Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. **Genetics**, Austin, TX, v. 164, n. 4, p. 1645-1656, 2003

RINALDI, V. A.; ABRIL, E. G.; CLARIÁ, J. J. Aspectos geotécnicos de las formaciones del delta del río Paraná y del estuario del río de La Plata. **Revista Internacional de Desastres Naturales, Accidentes e Infraestructura Civil**, Mayagüez, v. 6, n, 2, p. 131-148, 2006.

ROCHA, C. F. D. **Ecologia de *Liolaemus lutzae* (Sauria-Iguanidae) na Restinga da Barra de Maricá-RJ**. 101 p. Monografia de Bacharelado - Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.

SCHULTE II, J. A.; MACEY, J. R.; ESPINOZA, R.; LARSON, A. Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: multiple origin of viviparous reproduction and evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 69, n. 1, p. 79–102, 2000.

SILVA, M. C. **Filogeografia de três espécies de *Liolaemus* do grupo *boulengeri*, subgrupo “*wiegmannii*”: *L. occipitalis*, *L. arambarensis* e *L. wiegmanni***. Tese de Doutorado – Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SIMPSON, B. B. Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. In DUELLMAN, W. E. **The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal**. Lawrence, Kan: Monograph of the Museum of Natural History, 1979. p. 157– 188.

TOMAZELLI, L. J.; VILLWOCK, J. A. Mapeamento geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do RS. **GRAVEL**, Porto Alegre, n.3, p. 109-115, 2005.

TORREZ-PÉREZ, F.; LAMBOROT, M.; BORIC-BARGETTO, D. E. *et al.* Phylogeography of a mountain lizard species: an ancient fragmentation process

mediated by riverine barriers in the *Liolaemus monticola* complex (Sauria: Liolaemidae) **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, DE, v.45, n. 1, p. 72– 81, 2007.

VASCONCELOS, P. M.; BECKER, T. A.; RENNE, P. R.; BRIMHALL, G. H. Age and duration of weathering by  $^{40}\text{K}$ - $^{40}\text{Ar}$  and  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  analysis of potassium-manganese oxides. **Science**, Washington, US, v. 258, n. 5081, p. 451–455, 1992.

VERRASTRO, L. & KRAUSE L. Ciclo reprodutor de machos em *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885. (Sauria-Tropiduridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 227-231, 1999.

VERRASTRO, L. **Aspectos ecológicos e biológicos de uma população de *Liolaemus occipitalis* Boul. 1885, nas dunas costeiras da praia Jardim Atlântico, Tramandaí, RS. (Reptilia - Iguanidae)**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Curso de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

VERRASTRO, L.; BUJES, C. Ritmo de atividade de *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Sauria, Tropiduridae) na praia de Quintão, RS - Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 907-914, 1998.

VERRASTRO, L.; SCHOSSLER, M.; SILVA, C. M. *Liolaemus occipitalis*. **Herpetological Review**, Lawrence, Kan, v. 37, p. 495, 2006.

VERRASTRO, L.; VERONESE L.; BUJES C.; DIAS FILHOS, M. M. A new species of *Liolaemus* from southern Brazil (Iguania: Tropiduridae). **Herpetologica**, Lafayette, LA, v. 59, n. 1, p. 105-118, 2003.

VILWOCK, J.A.; TOMAZELLI, L.J. Geologia costeira do Rio Grande do Sul. **Notas Técnicas**, Porto Alegre n.8, p.1-45, dez.1995.

YANG Z.; RANNALA B. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 23, n. 1, p. 212-226, 2006.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In BRYSON, V.; VOGEL, H. J. **Evolving Genes and Proteins**. New York: Academic Press, 1965. p. 97-166.

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence data sets under the maximum likelihood criterion.** 125 p. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Faculty of the Graduate School, The University of Texas, Austin, 2006.

