



CAROLINE MARIA DA SILVA

**FILOGEOGRAFIA DE TRÊS ESPÉCIES DE *LIOLAEMUS* DO GRUPO *BOULENGERI*, SUBGRUPO
“*WIEGMANNII*”: *L. OCCIPITALIS*, *L. ARAMBARENSIS* E *L. WIEGMANNII*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Comparada
Orientador: Prof^ª.Dr^ª. Laura Verrastro
Co-Orientador: Prof^ª.Dr^ª. Gabriela P. Fernández

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2013

**FILOGEOGRAFIA DE TRÊS ESPÉCIES DE *LIOLAEMUS* DO GRUPO *BOULENGERI*, SUBGRUPO
“*WIEGMANNII*”: *L. OCCIPITALIS*, *L. ARAMBARENSIS* E *L. WIEGMANNII*.**

CAROLINE MARIA DA SILVA

Aprovada em ___ / ___ / ____

Dra. Larissa Rosa de Oliveira

Dr. Márcio Borges Martins

Dra. Mariana Morando

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2013

Agradecimentos

Após quatro longos anos, eu não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas e instituições que me apoiaram, incentivaram e colaboraram de diversas maneiras para que este trabalho fosse realizado. A ajuda de vocês é inestimável!

À minha Orientadora Dr^a. Laura Verrastro pelos muitos anos de amizade, ensinamentos, apoio, confiança, suporte financeiro e estrutura física, sem os quais este trabalho seria inviável;

À minha co-orientadora Dr^a. Gabriela Fernández por ter aceitado participar deste trabalho, pela amizade, pelos ensinamentos e pelas contribuições indispensáveis para a realização deste trabalho;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à CAPES pela bolsa de estudos;

Aos colegas do Departamento de Zoologia e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRGS pela ajuda e oportunidade;

Aos meus colegas, ex-colegas e grandes amigos do Laboratório de Herpetologia pela amizade, carinho, compreensão, paciência, parceria de festas, e, principalmente, pela fundamental ajuda em campo e no laboratório! Todos, mas todos vocês são ótimos!!!

Aos colegas, amigos e técnicos dos Laboratórios de Citogenética (Depto. de Genética) e de Biologia Molecular (Depto. de Zoologia) pela grande ajuda na parte molecular;

À minhas amigas Nina, Lari e Beti pelo apoio, pelos presentinhos, conversas, jantinhas, amizade e carinho! Obrigada gurias pela amizade maravilhosa de cada uma de vocês!

Ao pessoal do Projeto ADAAC "Bichos do Campus" por compreenderem minhas ausências em cuidar dos nossos afilhados caninos;

Aos meus amados "cuscos" do Vale por também compreenderem a ausência da dinda Carol na fase final deste trabalho. Gostaria de agradecê-los por me ensinarem a verdadeira essência da amizade, da confiança, da pura e irrestrita felicidade, e por fazerem aflorar a compaixão e a paciência que fazem de mim uma pessoa melhor.

Às minhas filhotas felinas Júlia e Tereza que muitas vezes dormiram ao meu lado enquanto eu escrevia esta Tese. Vocês também são criaturas especiais que tive o privilégio de encontrar. Minhas pequenas companheiras e amigas incondicionais!

Ao Adriano que me acompanhou durante boa parte da realização deste trabalho. Obrigada pelo companheirismo e amizade!

Ao Thiago, que nos últimos meses me apoiou e incentivou nesta reta final. Obrigada pelo carinho, amor e amizade, e por ter se tornado uma pessoa tão especial nestes últimos meses!

À toda minha família, especialmente às três mulheres especiais que me criaram, me cuidam, me levantam e me dão todo o apoio para continuar em frente: mãe Ignez, e minhas irmãs Dedé e Dida. Amo vocês!

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	10
I. Introdução Geral	13
I.1. O gênero <i>Liolaemus</i> WIEGMANN, 1834.....	13
I.2. O grupo <i>boulengeri</i> e o subgrupo <i>wiegmannii</i>	14
I.3. <i>Liolaemus arambarensis</i>	17
I.4. <i>Liolaemus occipitalis</i>	18
I.5. <i>Liolaemus wiegmanni</i>	20
I.6. Contexto Geológico.....	22
I.6.1. A Zona Costeira do Brasil.....	22
I.6.2. A Costa de Santa Catarina	23
I.6.3. A Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS)	26
I.6.4. A Costa do Uruguai.....	30
I.7. Contexto Genético	34
I.7.1. Marcadores moleculares no estudo de populações	34
I.7.1.1. O DNA Mitocondrial	35
I.8. Áreas de ocorrência de <i>Liolaemus</i>	40
II. Objetivos	45
III. Capítulos	46
III.1. Capítulo I - Phylogeography of <i>Liolaemus occipitalis</i> (sand lizard): an approach based on mitochondrial DNA	46
ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
MATERIAL AND METHODS	49
RESULTS	53
DISCUSSION	56
FUNDING	60
ACKNOWLEDGEMENTS.....	60
REFERENCES	60
Tables.....	65
Figures.....	70

III.2. Capítulo II - Comparative phylogeography of three species of the <i>Liolaemus</i> <i>wiegmannii</i> subgroup (Iguania: Liolaemidae): evolutionary history of <i>L. arambarensis</i> , <i>L. occipitalis</i> and <i>L. wiegmannii</i> in the Southern Brazilian and Uruguayan shore.....	74
ABSTRACT.....	75
INTRODUCTION.....	76
MATERIAL AND METHODS.....	78
RESULTS.....	81
DISCUSSION.....	87
FUNDING.....	93
ACKNOWLEDGEMENTS.....	93
REFERENCES.....	94
Tables.....	101
Figures.....	108
IV. Discussão Geral.....	116
V. Referências Bibliográficas.....	120
Author Guidelines: <i>Zoological Journal of the Linnean Society</i>	138

Resumo

O gênero *Liolaemus*, juntamente com *Phymaturus* e *Ctenoblepharys*, pertence à família Liolaemidae, e estende-se 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. As espécies *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmannii* pertencem ao grupo *wiegmannii*, e tem em comum o fato de ocorrerem na Costa Atlântica do sul da América do Sul, uma unidade geológica recente cuja formação pode ter influenciado a história evolutiva destas espécies. Também em comum, têm o fato de estarem ameaçadas devido à degradação ambiental de grande parte de suas áreas de ocorrência, em função, principalmente, de atividades antrópicas.

O principal objetivo desta tese foi o de caracterizar as espécies *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmannii* no que se refere à variabilidade genética e diferenciação geográfica (padrões filogeográficos) através da utilização de dois marcadores moleculares mitocondriais: Citocromo *b* (Cytb) e Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI). Também se objetivou examinar a concordância entre os padrões filogeográficos encontrados e a formação geológica das respectivas áreas de ocorrência de cada uma das espécies, bem como ampliar o conhecimento sobre elas e corroborar com possíveis estratégias de preservação.

Nossos resultados demonstram a existência de uma estruturação filogenética dentro de cada uma das três espécies estudadas. *Liolaemus occipitalis* estrutura-se em quatro haploclosos bem definidos, embora suas relações filogenéticas não possam ser inferidas com certeza. São dois clados ao sul do rio Mampituba, com claros sinais de expansão populacional, e dois ao norte do rio, sem os mesmos sinais de expansão. A evidência de expansão observada em um dos testes realizados (Bayesian Skyline Plot – BSP) data de ~40 mil anos (kya), e parece restrita às localidades de coleta no RS e Uruguai. Os clados do sul

coexistem em grande parte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS), destacando-se as localidades da região central com uma grande variabilidade genética. Em relação aos clados ao norte do rio Mampituba, destaca-se o isolamento genético do clado presente na ilha de Santa Catarina, o qual pode ser considerado como uma importante fonte de diversidade genética para *L. occipitalis*. Também se verificou uma ausência de relação entre a estrutura populacional observada e as atuais barreiras geográficas da área de ocorrência da espécie, possivelmente devido à instabilidade natural da área. Para *L. arambarensis* verificou-se a inegável importância da localidade de Barra do Ribeiro em termos de conservação do *pool* gênico da espécie, bem como a hipótese de que esta seria a "população fonte" para a fundação das demais. Nossas estimativas sugerem que não há evidências de expansão populacional recente para a espécie. Para *L. wiegmanni*, nossos dados sustentam uma forte divergência entre uma linhagem filogenética argentina e uma uruguaia, separadas pelo rio da Prata, também existindo uma estruturação dentro do clado uruguaio considerando a localidade de Colonia (costa platense) e as três localidades da costa Atlântica. Nossos dados sugerem um sinal de expansão populacional recente para *L. wiegmanni*, mas não foi possível demonstrar se este sinal foi exclusivo para as localidades de coleta uruguaias ou argentinas.

De acordo com nossas estimativas, o tempo até o ancestral comum mais recente (TMRCA) de cada uma das espécies, dos clados intra-específicos e das divergências entre as espécies cai no Pleistoceno. Observou-se que a separação das linhagens que deram origem a *L. occipitalis* e *L. arambarensis* teria ocorrido muito antes dos eventos climáticos pleistocênicos que originaram a Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS) (~400 kya), sugerindo que a linhagem que originou *L. occipitalis* seja muito mais antiga do que a unidade geomorfológica onde a maioria de suas populações é encontrada atualmente. A divergência entre seus clados, porém, ocorreu próximo do início da formação desta unidade geomorfológica, mas estas datas talvez indiquem o estabelecimento de

populações geograficamente divergentes que sejam associadas ao início da formação e expansão da planície costeira. Para *L. wiegmannii*, a divergência de seus dois subclados (localidades da costa uruguaia e da Argentina) pode estar associada com a formação do sistema do rio da Prata.

O tempo similar de expansão para *L. occipitalis* e *L. wiegmannii* (~40 kya) pode indicar que não somente a formação da PCRS foi importante na determinação do tamanho populacional, mas também os eventos climáticos que afetaram estas taxa podem ter desempenhado um importante papel na expansão populacional. Este modelo poderia explicar o intervalo existente entre o estabelecimento do terceiro ciclo deposicional (~120 kya) que implantou as restingas que delimitaram a Laguna dos Patos, e o sinal de expansão populacional que ocorreu somente ~40 kya.

De forma geral, pode-se dizer que a variabilidade genética e a distribuição geográfica observadas entre as populações das três espécies foram moldadas em boa parte pela evolução geológica da área de ocorrência de cada uma delas, bem como pelas pressões antrópicas sofridas por estas. No entanto, essa mesma pressão antrópica que possivelmente ajudou a moldar o atual cenário genético das espécies está, sem dúvida, entre as principais causas do desaparecimento de muitas de suas populações.

Abstract

The genera *Liolaemus*, *Phymaturus* and *Ctenoblepharys* belong to the family Liolaemidae, and is distributed from the central coast of Peru southward through Bolivia, Paraguay, Chile and Argentina, reaching the east coast of Uruguay and south and southeast Brazil. The species *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmanni* belong to the *wiegmannii* group, and have in common the occurrence in the Atlantic Coast of southern South America (even though *L. wiegmanni* has a more widespread distribution in Argentina), a recent geologic unit whose formation might have influenced the evolutionary history of these species. All three species are threatened due to environmental degradation of much of their occurrence area, due mainly to human activities.

The main objective of this thesis was to characterize the species *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmanni* regarding the genetic variability and the geographic differentiation (phylogeographic patterns) using two mitochondrial markers: Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) and Cytochrome *b* (Cytb). It also aimed to examine the concordance between phylogeographic patterns found and the geological formation of the respective areas of occurrence of each species, as well as to increase the knowledge about it and corroborate with possible conservation strategies.

Our results show the existence of a phylogenetic structure within each of the three species. For *L. occipitalis* our data reveal four distinct clades, and even though their phylogenetic relationship cannot be inferred with certainty, two of them are exclusive from the state of Santa Catarina, one being found in insular populations and the other in continental populations; one is restricted to the state of Rio Grande do Sul, and the other is more widespread, being found from the state of Santa Catarina to Uruguay. There is evidence of population expansion in *L. occipitalis* ~40 kya, however, the expansion seems

to be restricted to populations from the state of Rio Grande do Sul and Uruguay, with populations from the state of Santa Catarina showing evidence of a constant population size. The southern clades coexist in much of the Coastal Plain of the state of Rio Grande do Sul (CPRS), highlighting the high genetic variability of populations from the central region. Regarding the clades from the north of the Mampituba river, it is noteworthy the genetic isolation of the clade on the island of Santa Catarina, which can be considered as an important source of genetic diversity for *L. occipitalis*. We also found a lack of relationship between the partitioning of the haplotype variability and extant geographical barriers between the population groups, possibly due to the natural instability of the occurrence region of the species. We found an undeniable importance of the *L. arambarensis* population from Barra do Ribeiro in terms of the preservation of the species' gene pool, as well as the hypothesis that this population might be the "population-source" for the foundation of the others. Our estimates suggest that there is no evidence of recent population expansion for this species. Concerning *L. wiegmannii*, we found a strong genetic structure separating Argentinean and Uruguayan populations, corroborating the idea that the La Plata River is an effective barrier against the gene flow in this species. There was also some structure within Uruguay considering the population of Colonia, in the La Plata River coast, and the three populations from the Atlantic coast (Valizas, Costa Azul, La Paloma). Our data showed a signal of recent (~40 kya) population expansion for the whole species (considering the populations samples in this study), but our data could not show if this signal was exclusive from the Uruguayan or Argentinean population.

Our estimates for the time to the most recent common ancestor (TMRCA) of species, intraspecific clades, and species divergence fall in the Pleistocene. We observed that the divergence between *L. arambarensis* and *L. occipitalis* is much older than the initial formation of the CPRS by 400 kya, suggesting that the lineage leading to *L. occipitalis* is much older than the geomorphological unit where it is mostly found nowadays. The divergence among clades within *L. occipitalis* (~335 kya) is close to the initial formation of

the CPRS, however, it is possible that this date indicates the establishment of geographic divergent populations which could be associated with the initial formation and expansion of the CPRS. For *L. wiegmannii*, the divergence of its two subclades, which separate populations in coastal Uruguay from those in Argentina, may be associated with the formation of the La Plata River system.

The similar expansion times for *L. occipitalis* and *L. wiegmannii* might indicate that not only the formation of the CPRS was important for determining population size, but also that climatic events affecting all these taxa may have played a role in population expansions. This model would explain the gap between the establishment of the third depositional cycle (~120 kya) which formed most of the sandbar closing the Patos lagoon, and the signal of population expansion which occur only by ~40kya.

In general, we can say that the genetic variability and geographic distribution observed among populations of the three species were shaped mainly by geological evolution of the occurrence area of each of them, as well as by anthropogenic pressures suffered by them. However, this same human pressure that possibly helped shape the current genetic scenario of the species is undoubtedly among the main causes of the disappearance of many of its populations.

I. Introdução Geral

I.1. O gênero *Liolaemus* WIEGMANN, 1834

A herpetofauna da parte temperada da América do Sul é dominada em riqueza de espécies por lagartos do clado Liolaemini, o qual inclui os gêneros *Liolaemus* WIEGMANN, 1834 (aproximadamente 231 espécies (BREITMAN *et al.* 2011)), *Phymaturus* GRAVENHORST, 1837 (cerca de 38 espécies reconhecidas e 22 espécies candidatas (MORANDO *et al.* 2013)), e *Ctenoblepharys* TSCHUDI, 1845 (uma espécie). A topologia do clado [(*Liolaemus* + *Phymaturus*) *Ctenoblepharys*] é bem suportada por dados moleculares e morfológicos (SCHULTE *et al.* 2003).

O gênero *Liolaemus*, que juntamente com *Phymaturus* e *Ctenoblepharys* pertence à família Liolaemidae (FROST *et al.* 2001), parece ter uma longa história evolutiva (SCHULTE *et al.* 2000), e uma mais provável origem e radiação nas terras altas dos Andes e/ou da Patagônia (DUELLMAN 1979). *Liolaemus* é um gênero que inclui lagartos de tamanho moderado, principalmente pequenos, restritos à região austral da América do Sul, onde ocupam uma grande diversidade de habitats, desde o nível do mar até 5.000 metros de altitude (ETHERIDGE 2000). O gênero apresenta uma grande versatilidade ecológica, incluindo espécies com hábitos saxícolas, arborícolas e psamófilos, bem como uma ampla diversidade biológica: reprodução ovípara (principalmente) ou vivípara, e a maior parte das espécies com uma dieta insetívora, mas existindo também algumas herbívoras e onívoras. Exibem também uma grande variedade de padrões de coloração (geralmente críptico), tamanho e morfologia (DONOSO-BARROS 1966, ABDALA 2007, BREITMAN *et al.* 2013).

Estendendo-se desde a costa central do Peru em direção ao sul através da Bolívia, Paraguai, Chile, e Argentina, o gênero *Liolaemus* atinge a costa atlântica do Uruguai, e sul e sudeste do Brasil (ETHERIDGE & ESPINOZA 2000). É o gênero mais rico em espécies dentre os squamatas da parte austral da América do Sul, sendo descritas nos últimos 15 anos mais

de 50 espécies, principalmente na Argentina e no Chile, e novas descrições são publicadas numa taxa de quatro ou cinco por ano. Uma das principais causas deste acentuado e recente aumento do número de espécies conhecidas é que novas coletas estão sendo feitas em áreas ainda não exploradas dos Andes e da Patagônia (ABDALA *et al.* 2008, AVILA *et al.* 2010a, b). Um detalhado estudo de um único complexo de espécies sugeriu que o número total de espécies atuais pode ser aproximadamente o triplo do número conhecido da época (MORANDO *et al.* 2003).

As regiões de ocorrência de *Liolaemus* incluem extensas áreas de areia eólica: as praias arenosas do Chile, Argentina, Uruguai e o sul do Brasil, assim como areias planas e sistemas de dunas dispersos 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.

1.2. O grupo *boulengeri* e o subgrupo *wiegmannii*

O grupo *boulengeri* (ETHERIDGE 1995) é um reflexo, em menor escala, do gênero *Liolaemus*, contendo uma variedade surpreendente de espécies com diferentes formas corporais e apresentando diferentes padrões de coloração. O grupo *boulengeri* distribui-se principalmente no lado oriental da cordilheira dos Andes e a maioria das espécies está na Argentina, embora também haja espécies no alto dos Andes na Bolívia e no Chile, no Chaco paraguaio, na Puna chilena, no extremo sul da Patagônia chilena, e ao longo das costas do Uruguai e do Brasil (ABDALA 2007).

O subgrupo *wiegmannii* caracteriza-se pela presença de escamas lorilabiais menores que as supralabiais e usualmente duas fileiras de escamas lorilabiais entre a subocular e as supralabiais. As escamas supralabiais são estreitas, sendo as posteriores mais alongadas;

sublabiais em contato com a escama mental e a mental mais larga posteriormente. As infralabiais apresentam variação desde planas a côncavas (ETHERIDGE 1995).

O subgrupo *wiegmannii* também é conhecido como o grupo dos “lagartos arenícolas”, devido às suas excepcionais especializações para viver em dunas desertas com altas temperaturas e vegetação xerófila pobre (ABDALA 2007). De todas as espécies do subgrupo *wiegmannii*, *Liolaemus wiegmannii* é considerada a menos especializada, não sendo estritamente arenícola (LAURENT 1983, 1984; HALLOY *et al.* 1998; ETHERIDGE 2000). ETHERIDGE (2000) realizou uma análise filogenética do grupo *boulengeri*, baseado em 39 caracteres morfológicos e comportamentais; desse grupo separa-se como um clado bem suportado o subgrupo *wiegmannii* (Fig. 1a). Este trabalho, juntamente 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 o reconhecimento do subgrupo *wiegmannii* como monofilético.

O subgrupo *wiegmannii*, até o momento, inclui onze espécies:

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

- *Liolaemus cuyumhue* AVILA *et al.*, 2009: ocorrência conhecida somente para o Departamento de Añelo (localidade tipo), Província de Neuquén, Argentina (AVILA *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 (RS) e sul de Santa Catarina (SC) (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 Provincia de Mendoza, Departamento de San Rafael, Argentina (ETHERIDGE 2000);

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

- *Liolaemus salinicola* LAURENT, 1986: na Provincia de Catamarca, Argentina (CEI 1986);

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

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

Estes lagartos exibem um extenso espectro de adaptações morfológicas e comportamentais que facilitam a vida embaixo e na superfície da areia, assim como focinho em forma de cunha, especialização do esterno para respiração embaixo da areia, redução do dimorfismo sexual e coloração críptica, mergulho rápido na areia como escape e refúgio diurno (ETHERIDGE 2000).

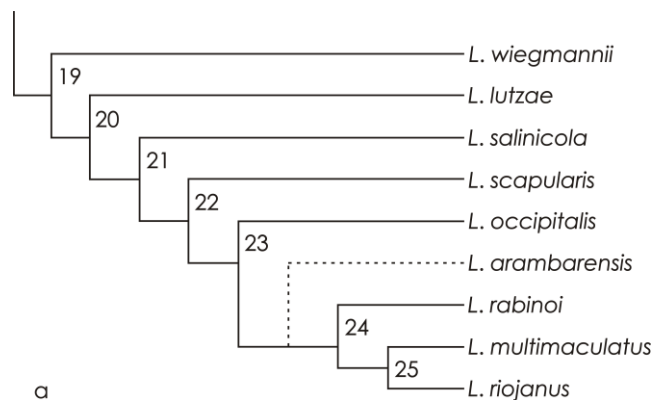


Figura 1 – Proposta de relações filogenéticas entre as espécies do grupo *wiegmannii*. a. Segundo ETHERIDGE (2000), com a sugestão para *Liolaemus arambarensis* como um grupo irmão do ramo 24 (VERRASTRO *et al.* 2003).

1.3. *Liolaemus arambarensis*

Liolaemus arambarensis (Fig. 2) é uma espécie endêmica dos ambientes de restingas da Laguna dos Patos; tendo distribuição conhecida desde Viamão até o Município de São Lourenço (Fig. 3). Tem cerca de 56mm de comprimento rostro-cloacal e apresenta uma coloração críptica com o ambiente, confundindo-se com o substrato onde vive. Alimenta-se basicamente de insetos, aranhas e material vegetal. Apresenta uma reprodução 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 *Liolaemus wiegmanni*. Esta determinação foi revista, pois se verificaram diferenças marcantes no tamanho corporal, desenhos do corpo e lepidose, resultando na descrição de uma nova espécie para o Rio Grande do Sul (VERRASTRO *et al.* 2003).



Figura 2 – Exemplar de *Liolaemus arambarensis* sobre substrato de seu habitat natural (Município de Barra do Ribeiro/RS) (Foto: M.B. Martins).

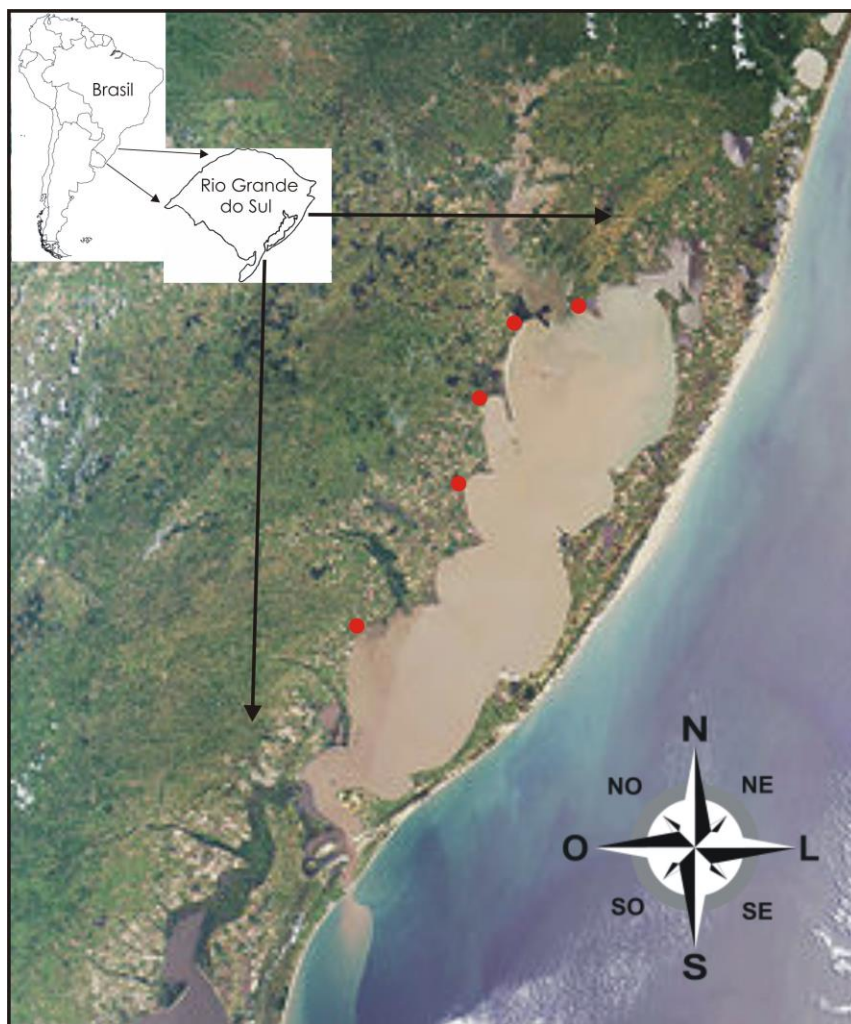


Figura 3 – Distribuição de *Liolaemus arambarensis* (pontos vermelhos) nos ambientes de restinga na margem oeste da Laguna dos Patos, RS/Brasil.

1.4. *Liolaemus occipitalis*

Liolaemus occipitalis (Fig. 4) foi descrito por BOULENGER (1885), tendo como localidade-tipo a cidade de Rio Grande (RS/Brasil). Esta espécie ocorre no extremo sul do Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina (PETERS *et al.* 1986; LEMA 1994; VERRASTRO 1991; VERRASTRO & BUJES 1998; VERRASTRO & KRAUSE 1999), e na costa do Uruguai, no Departamento de Rocha, desde Barra Del Chuy até a margem esquerda do Arroio Valizas (VERRASTRO *et al.* 2006) (Fig. 5).

Os trabalhos existentes sobre esta espécie são de caráter taxonômico, biogeográfico (GUDYNAS 1981a, b, c; VANZOLINI & AB'SABER 1968), osteológico (KELLER & KRAUSE 1986) e ecológico (VERRASTRO 1991; VERRASTRO & KRAUSE 1994; VERRASTRO & BUJES 1998; BUJES & VERRASTRO 1998; VERRASTRO & KRAUSE 1999; VERRASTRO 2004; BUJES & VERRASTRO 2006, 2008).

Segundo VERRASTRO & KRAUSE (1999), os indivíduos de *L. occipitalis* atingem sua maturação sexual antes do primeiro ano de vida, estando aptos à reprodução já na estação reprodutiva subsequente à que nasceram. Existe somente um período reprodutivo anual, que inicia ao final de agosto e termina, com os últimos nascimentos, ao final de março. O período reprodutivo dos machos se dá desde o final de agosto até o final de dezembro, e o das fêmeas estende-se desde o início de setembro até o final de fevereiro. O comprimento médio dos adultos é de 60,2mm em machos e 53,2mm em fêmeas (VERRASTRO & KRAUSE 1994).

Quanto à alimentação, *L. occipitalis* é uma espécie basicamente insetívora, com consumo ocasional de vegetais, consumidora de uma grande variedade de itens alimentares, caracterizando-se como um predador generalista (ELY & VERRASTRO 2004).



Figura 4 – Exemplar de *Liolaemus occipitalis* sobre substrato de seu habitat natural (Município de Mostardas/RS) (Foto: L. Verrastro).

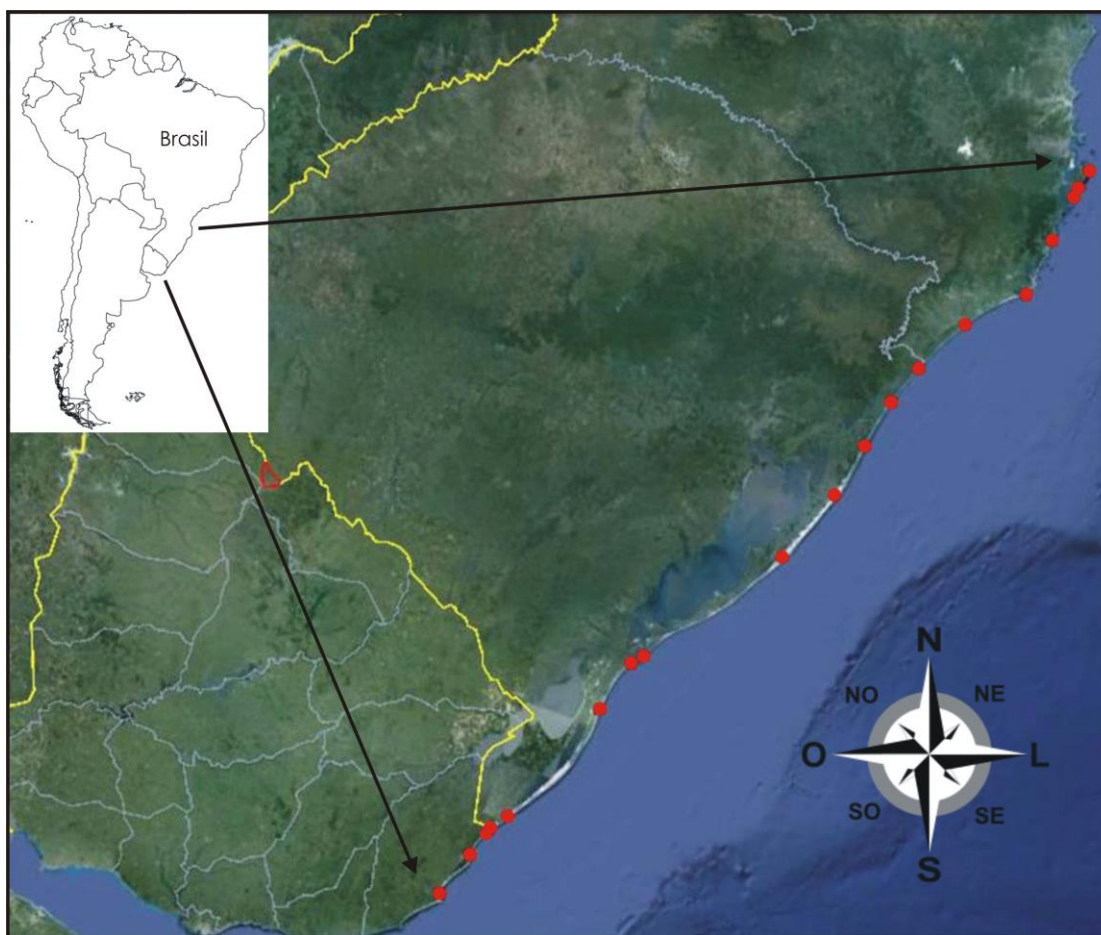


Figura 5 – Distribuição de *Liolaemus occipitalis* (pontos vermelhos) ao longo da costa do Rio Grande do Sul, sul de Santa Catarina (Brasil), e parte do Departamento de Rocha (Uruguai).

1.5. *Liolaemus wiegmanni*

Liolaemus wiegmanni (Fig. 6) ocupa uma variedade de habitats através de sua extensa e fragmentada área de ocorrência, frequentemente encontrado sobre dunas e solos arenosos (ETHERIDGE 2000). Variações de lepidose, dos padrões de coloração e do desenho corporal foram observadas entre diferentes populações estudadas por CEI (1979). *Liolaemus wiegmanni* caracteriza-se por uma reprodução ovípara e dieta insetívora (DONOSO-BARROS 1970; CEI 1986), sendo um predador de estratégia tipo senta-e-espera (GUDYNAS & RUDOLF 1987). A localidade tipo foi registrada *in error* para o Chile, no

entanto BELL (1843) indica a ocorrência desta espécie para Bahia Blanca, Rio Negro (Argentina) e Maldonado (Uruguai), uma vez que faz parte do lote trazido desta região por Charles Darwin. Estes dados são confirmados por GALLARDO (1966). A distribuição de *L. wiegmanni*, segundo CEI (1979, 1986), LAURENT & TERAN (1981) e CABRERA & BEE DE SPERONI (1986), é muito ampla na Argentina (Entre Ríos, Buenos Aires, Bahía Blanca, La Pampa, San Luis, Mendoza, Tucumán e Jujuy), Uruguai (Fig. 7) e, segundo estes autores, também no sul do Brasil (onde se verificou, posteriormente, tratar-se de uma espécie diferente, resultando na descrição de *L. arambarensis*). Entretanto, esta ampla distribuição geográfica e estudos moleculares preliminares sugerem que *L. wiegmanni* possa ser um complexo de diversas espécies (AVILA 2003, MORANDO *et al.* 2004, AVILA *et al.* 2006).



Figura 6 – Exemplar de *Liolaemus wiegmanni* sobre substrato de seu habitat natural (Município de Valizas/Departamento de Rocha, Uruguai) (Foto: L. Verrastro).

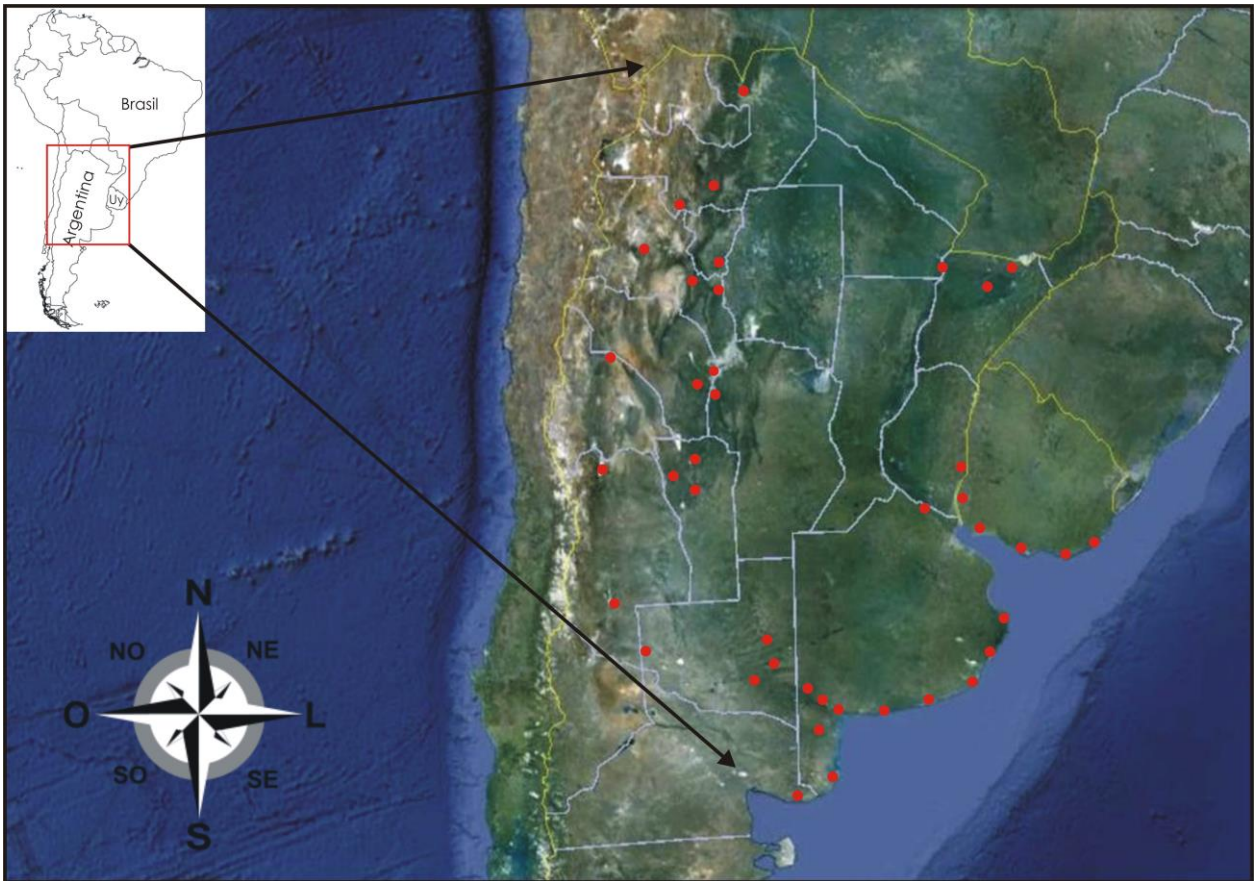


Figura 7 – Distribuição de *Liolaemus wiegmanni* (pontos vermelhos) na costa do Uruguai (Uy), e no interior e costa da Argentina.

1.6. Contexto Geológico

1.6.1. A Zona Costeira do Brasil

A zona costeira do Brasil estende-se por aproximadamente 9.200 km e apresenta um conjunto muito diversificado de ambientes costeiros que evoluiu durante o Quaternário, em resposta a mudanças no clima e no nível do mar. Foram estas mudanças que adicionaram os elementos morfológicos mais jovens da zona costeira brasileira. Durante todo o período Quaternário a posição média da linha de costa localizava-se 30 m abaixo da linha de costa atual sobre a plataforma continental. Adicionalmente, a maior parte da zona costeira do Brasil passou por uma incipiente e forçada regressão relacionada a uma

queda de aproximadamente 2-5 m no nível do mar durante os últimos 6-5 mil anos (ka). Durante os últimos 420 ka, no mínimo cinco maiores eventos de transgressão-regressão marinha (relacionados com a alternância de períodos glaciais e interglaciais) são reportados (DILLENBURG & HESP 2009).

1.6.2. A Costa de Santa Catarina

A zona costeira do estado de Santa Catarina (SC) localiza-se na região Sul e costas Sudeste e Sul do Brasil, entre as latitudes sul de 25°57'41" e 29°23'55". A província costeira de Santa Catarina possui uma área de 66.212 km², aproximadamente 430 km de extensão, e larguras médias de 130 km. É constituída de duas unidades geológicas maiores: o embasamento e as bacias sedimentares marginais de Pelotas - ao sul - e de Santos - ao norte. As bacias limitam-se na Plataforma de Florianópolis, nas imediações do cabo de Santa Marta (28°27'S), e em ambas os sedimentos estão associados às transgressões e regressões marinhas que ocorreram desde o Cretáceo inferior ao Quaternário (HORN FILHO 2003). A costa de SC exhibe significantes variações tanto nos ventos quanto na energia das ondas, e tem exemplos de todos os principais tipos de barreiras (DILLENBURG & HESP 2009).

Uma recente revisão feita por ANGULO *et al.* (2006) indicou que o nível do mar durante o Holoceno ultrapassou na região de SC o nível atual há cerca de 7 ka, e atingiu o maior nível há cerca de 5.7 ka. A altura máxima atingida foi de cerca de 2.5m acima do nível atual, e o nível do mar em seguida caiu gradualmente ao nível atual.

Os tipos de barreiras da costa catarinense

Diversos tipos de barreiras (sistemas deposicionais) e formas associadas ocorrem ao longo da costa de SC e norte do RS. As diferenças no desenvolvimento das barreiras ao longo da costa catarinense estão relacionadas com eventos geológicos e gradientes da

plataforma pré-existent, o tipo de sedimento e seu fornecimento, energia das ondas, tipos de praias, direção do vento resultante, e orientação costeira a ventos dominantes ou predominantes (DILLENBURG & HESP 2009). A planície costeira de SC abrange depósitos característicos de dois sistemas deposicionais: sistema continental e sistema transicional ou costeiro. O sistema continental está associado às encostas das terras altas, englobando depósitos geralmente datados do Quaternário indiferenciado (~2 ka até o presente). O sistema costeiro, na maioria das regiões do tipo laguna-barreira, compreende depósitos pleistocênicos e holocênicos (120ka-18ka e 5.1ka até o presente) (HORN FILHO 2003).

De acordo com DILLENBURG & HESP (2009), existem essencialmente quatro províncias geomórficas que podem ser identificadas, sendo que três delas (II, III e IV) abrangem nossa área de trabalho (Fig. 8): A província II estende-se desde Itajaí, ao longo da costa continental por trás da Ilha de SC, até o extremo norte da Praia da Pinheira. Caracteriza-se por uma costa rochosa, com pequenas praias e enseadas. As praias do sul apresentam barreiras que compreendem uma única duna frontal, indicando um pequeno fornecimento de sedimentos arenosos durante o Holoceno. As maiores baías são profundamente embainhadas entre promontórios ou ficam atrás da Ilha de SC e são ambientes protegidos. A província III estende-se do norte da Ilha de SC ao Farol de Santa Marta. Caracteriza-se por grandes promontórios, algumas praias longas e relativamente retas a arqueadas, costa rochosa e pequenas praias entre dois promontórios, e barreiras dominadas por campos de dunas transgressivas (formadas pelos sedimentos introduzidos pelo avanço do mar). Existem dois complexos de barreiras nesta província (um na Praia do Gi e outro na Praia da Pinheira), e quatro principais campos de dunas, um relativamente pequeno em Pântano do Sul, e três maiores nas Praias da Joaquina, do Moçambique e do Santinho. Todos os grandes campos de dunas são ativos e mostram uma tendência de migração de sul para norte. A província IV estende-se do Farol de Santa Marta até a borda com o RS. A linha de costa tem um perfil levemente côncavo caracterizado por praias longas e retas. As barreiras compreendem campos de dunas

transgressivas ativos e remanescentes que progradaram durante o Holoceno (~7 ka), com exceção de uma barreira complexa próximo do extremo norte de Torres. Este sistema de barreira estende-se em direção ao sul passando o Chuí e entrando no Uruguai. A barreira que se estende do Cabo de Santa Marta à Praia do Camacho (~28°36' a 28°42') caracteriza-se por um vasto campo de dunas transgressivas. Atrás dos depósitos da barreira, existe um complexo lagunar (lagoas de Garopaba do Sul, do Camacho e de Santa Marta) criado durante o nível máximo da transgressão marinha pós-glacial.

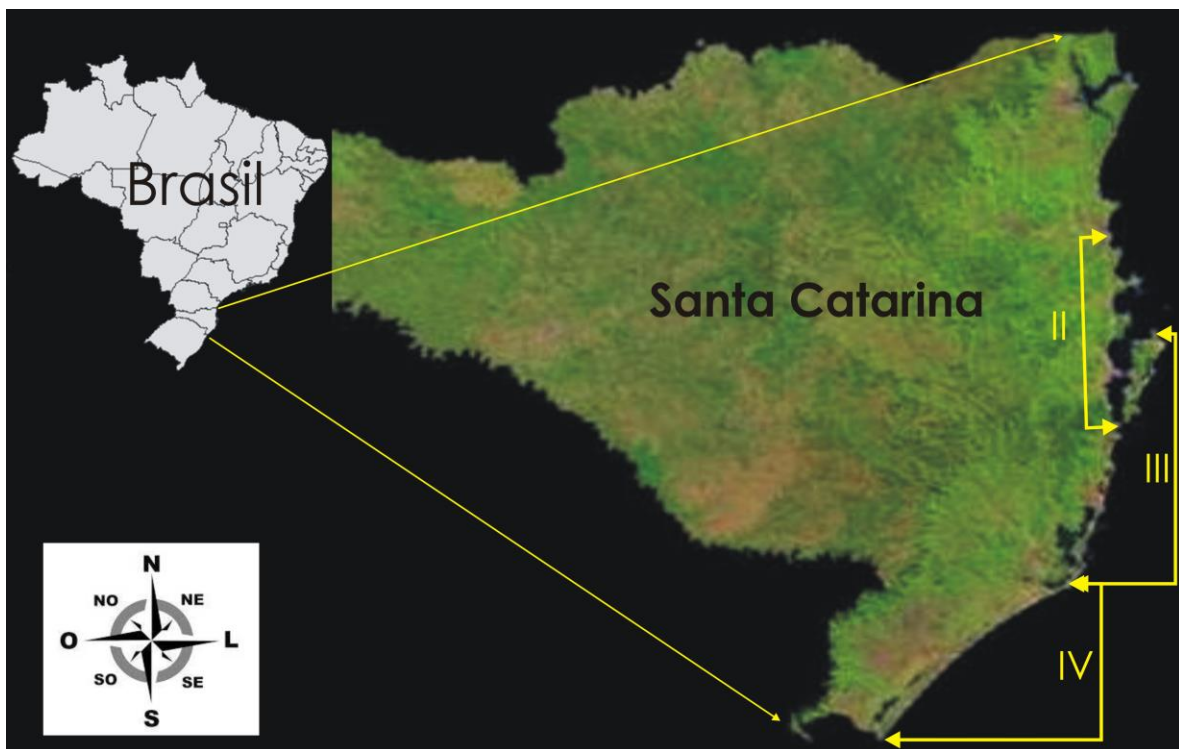


Figura 8 - Mapa de satélite da costa de Santa Catarina com a localização aproximada das três províncias geomórficas que abrangem nossa área de trabalho. II - Província II (de Itajaí até o extremo norte da Praia da Pinheira); III – Província III (do norte da Ilha de SC ao Farol de Santa Marta); IV - Província IV (do Farol de Santa Marta até a borda com o RS).

1.6.3. A Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS)

O termo Província Costeira é amplamente utilizado para designar um grupo de elementos geológicos característicos da margem continental brasileira na atualidade. Durante o Cenozóico, a erosão dos terrenos elevados situados a oeste gerou fácies sedimentares que se acumularam ao longo da Província Costeira do RS. Em consequência desse processo, a Província Costeira do RS pode ser dividida em dois compartimentos geomorfológicos: o das “terras altas” e o das “terras baixas” (VILLWOCK & TOMAZELLI 1995). Fazem parte do compartimento das “terras altas” o Planalto Sul-riograndense, a Depressão Central e o Planalto das Araucárias. Enquanto que o compartimento das “terras baixas” é composto pela Planície Costeira e pela plataforma continental adjacente (WESCHENFELDER 2005).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS) constitui a mais ampla planície litorânea do Brasil, cobrindo cerca de 33.000km², e apresentando uma extensão de cerca de 620km e até 80km de largura (TOMAZELLI *et al.* 2000). Ela é uniforme e suavemente ondulada consistindo de duas grandes e subdivididas projeções em direção ao mar e duas reentrâncias em direção a terra, com orientação nordeste – sudoeste (DILLENBURG *et al.* 2000; DILLENBURG *et al.* 2005).

A PCRS compreende um grande número de corpos d'água costeiros, alguns deles de grandes dimensões, como a Laguna dos Patos com uma área de 10.000 km² e a Laguna Mirim com uma área de 3.770 km² (TOMAZELLI *et al.* 2000). A Laguna dos Patos é a bacia de captação da rede de drenagem da Bacia Fluvial do Sudeste do RS e do Nordeste da República do Uruguai. A extensão de sua superfície de captação alcança 180.000 km² e as águas captadas desembocam diretamente no Oceano Atlântico, através do Canal de Rio Grande, localizado no extremo sul da laguna (WESCHENFELDER *et al.* 2005). O Canal de Rio Grande, juntamente com a Barra da Laguna de Tramandaí, são as duas únicas

descontinuidades que ocorrem na PCRS, as quais são permanentemente abertas por causa de uma contínua e grande descarga de água doce no Oceano Atlântico (DILLENBURG *et al.* 2000).

As barreiras costeiras representam o principal sistema deposicional da PCRS, sendo que os eventos de transgressão-regressão do nível do mar que a originaram, geraram quatro extensos sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira, paralelos à linha de costa (VILLWOCK & TOMAZELLI 1995; TOMAZELLI & VILLWOCK 2005) (Fig. 9). A formação destes sistemas foi relacionada com a alternância cíclica de períodos frios e quentes ocorridos durante o Pleistoceno e Holoceno, os estágios glaciais e interglaciais. Durante estes períodos havia a fusão (estágios interglaciais) ou crescimento (estágios glaciais) das regiões polares e, conseqüentemente, subida (transgressão) ou descida (regressão) do nível do mar (VILLWOCK & TOMAZELLI 1995). Há cerca de 500 mil anos atrás, o nível do mar na região do RS encontrava-se 70 m abaixo do nível atual e a linha de costa recuada mais de 100 km. Há aproximadamente 400 ka ocorreu uma grande transgressão marinha e, no RS, o mar invadiu toda a região de Porto Alegre, ficando somente os morros emersos. Assim, formou-se o Sistema Depositional Laguna-Barreira I (o mais antigo). A Barreira I se desenvolveu na porção noroeste da planície costeira onde ocupa uma faixa com orientação nordeste - sudoeste (~150km de extensão e ~5-10km de largura). Seu crescimento se deu principalmente a partir da acumulação de sedimentos eólicos que se ancoraram sobre altos do embasamento. Após o primeiro evento transgressivo, o mar regrediu, e cerca de 75 ka depois, houve outra transgressão, sendo que a área ocupada pelo mar foi consideravelmente menor que a anterior. O Sistema Depositional Laguna-Barreira II é o resultado deste segundo evento transgressivo-regressivo pleistocênio (aproximadamente 325 ka). Na parte norte da planície costeira, as fácies praias e eólicas da Barreira II ficaram preservadas como um grande pontal arenoso desenvolvido a leste da Lagoa dos Barros. Na parte sul, como um antigo sistema de ilhas-barreira, responsável pelo primeiro isolamento da Lagoa Mirim. Novamente o mar recuou e, há ~120 ka, ocorreu um terceiro

evento transgressivo (último pico interglacial pleistocênico) que resultou na formação da terceira barreira da PCRS e das restingas que delimitaram a Laguna dos Patos. O Sistema Depositional Laguna-Barreira III encontra-se muito bem preservado no presente, e seu desenvolvimento foi responsável pela implantação final da Laguna dos Patos. Os depósitos correlatos à Barreira III se estendem, de maneira quase contínua, ao longo de toda a PCRS, desde Torres até o Chuí. A formação da barreira arenosa mais recente (Sistema Depositional Laguna-Barreira IV) ocorreu há ~5 ka, durante o Holoceno, como consequência da última grande transgressão pós-glacial. A Barreira IV foi o episódio final consequente das variações do nível do mar que afetaram este setor costeiro. O campo de dunas eólicas da Barreira IV é bem desenvolvido, e estende-se praticamente ao longo de toda a linha de costa. Este último sistema deposicional ainda está ativo (TOMAZELLI & VILLWOCK 2005; WESCHENFELDER *et al.* 2005; DILLENBURG & HESP 2009). Após esse último evento, formou-se uma restinga arenosa entre o planalto e o mar que promoveu a ligação da PCRS com o litoral norte do País, permitindo a migração da flora e fauna atuais e interrompendo o curso dos rios. A partir de então, toda a drenagem continental que anteriormente atingia a quebra da plataforma continental ficou retida no interior deste sistema lagunar (WESCHENFELDER *et al.* 2005). As desembocaduras dos estuários e os canais fluviais foram soterrados pelas areias transgressivas. Desta forma, o registro dos canais soterrados representa evidências da drenagem pleistocênica sobre a antiga planície costeira, na atual plataforma continental (ABREU & CALLIARI 2005). Paleocanais detectados na linha de costa atual podem representar o antigo curso de alguns dos principais rios do estado, que fragmentavam a costa, desaguardo diretamente no Oceano Atlântico (CORRÊA *et al.* 2004; WESCHENFELDER 2005; WESCHENFELDER *et al.* 2008a,b) (Fig. 10).

Este é o mais longo sistema de barreiras da América do Sul e certamente um dos mais longos do mundo. Os sedimentos para construir esta grande planície costeira vieram possivelmente do rio La Plata localizado ao sul com contribuição de rios locais (Camaquã e Jacuí) (DILLENBURG *et al.* 2000). A PCRS penetra no nordeste do Uruguai (URIEN *et al.* 1980).

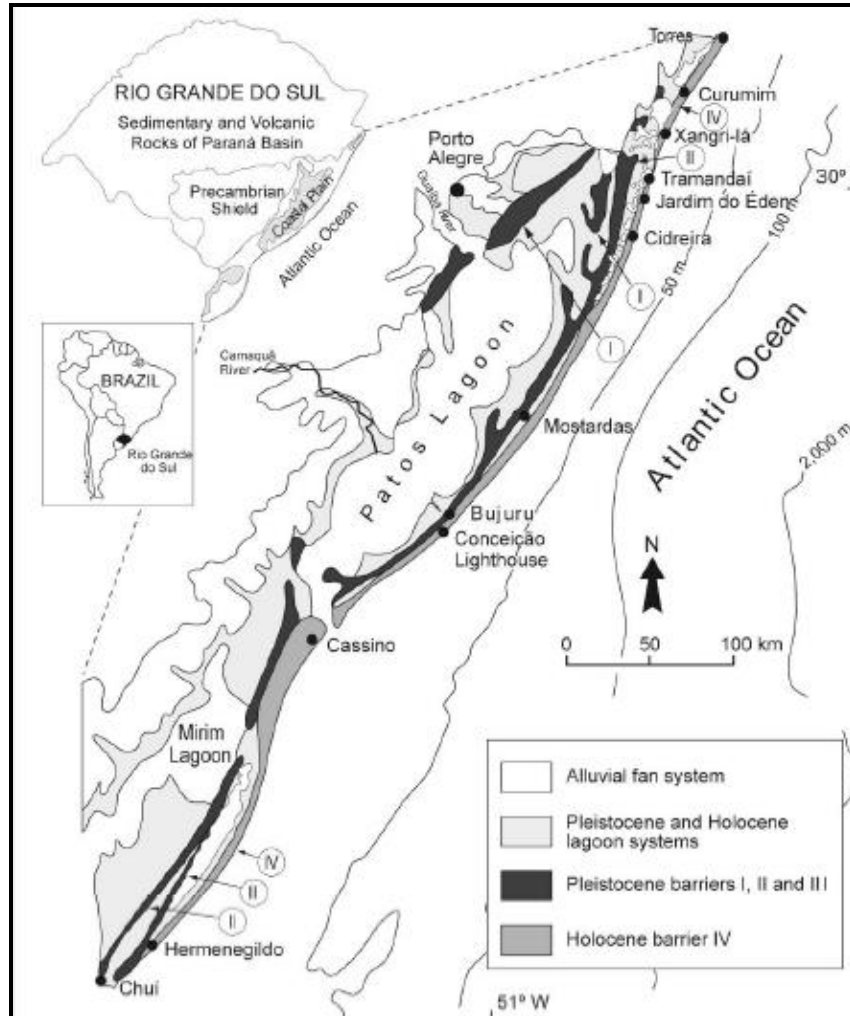


Figura 9 - Cenário paleogeográfico da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Extraído de DILLENBURG & HESP 2009).

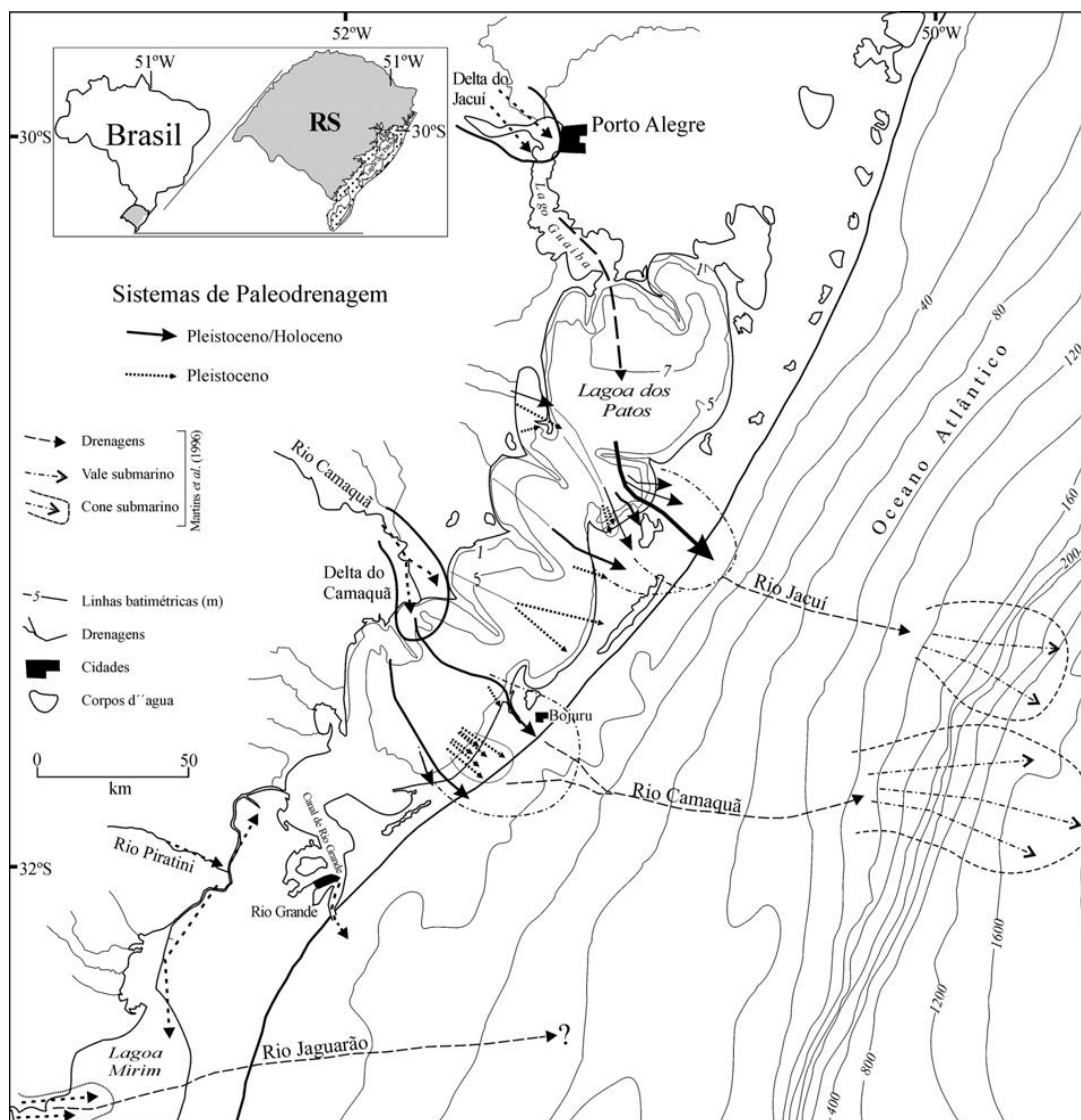


Figura 10 - Sistemas de paleodrenagens identificados através de dados sísmicos (Extraído de WESCHENFELDER *et al.* 2008a).

1.6.4. A Costa do Uruguai

A República Oriental do Uruguai tem uma superfície de 176.215km², e localiza-se entre 30° e 35° de latitude sul, entre o Brasil e a Argentina (CLAES/PNUMA/DINAMA 2008). A costa uruguaia (Fig. 11) caracteriza-se como um conjunto de ambientes, majoritariamente praias arenosas, dominados pela ação das ondas. Estende-se por aproximadamente 700 km entre a desembocadura do rio Negro e o limite com o Brasil (PANARIO & GUTIÉRREZ 2005),

contando com cerca de 232km de costa sobre o Oceano Atlântico e 486 km sobre o Rio de la Plata (CLAES/PNUMA/DINAMA 2008). A costa atlântica estende-se desde Punta del Este até a Barra del Chuy, abrangendo a totalidade da costa do Departamento de Rocha e parte da costa do Departamento de Maldonado. Consiste de um estreito cinturão de praias de morfologias variadas e lagunas, separadas por pontais rochosos (La Coronilla, Cabo Polônio, Cabo Santa Maria, Punta José Ignacio e Punta del Este). A feição mais característica desta planície costeira são as lagunas litorâneas em sua maioria de águas doces (Fig. 12). Há alguns milhares de anos atrás, onde atualmente existem esta série de lagunas costeiras, marismas e banhados adjacentes ao litoral arenoso, existiam antigas baías ou pequenos paleoestuários, cujas desembocaduras se fecharam ao desenvolver-se uma barra arenosa durante a estabilização do mar em sua posição atual (URIEN *et al.* 1980). A costa platense estende-se desde Nueva Palmira até Punta del Este, abrangendo parte da zona costeira dos Departamentos de Colonia e Maldonado, e a totalidade da costa de San José, Montevideo e Canelones. Nas Terras Baixas tem-se a Planície Costeira, que apresenta, assim como a costa atlântica, Planícies Aluviais Internas, Barreiras e Complexos Barreiras-Lagunas (laguna del Sauce, banhados de Carrasco, paleolagunas de Arazati) (AGUILAR *et al.* 2010).

Evolução Geológica do litoral uruguaio

Durante o Terciário, uma grande parte das formações Cenozoicas que se depositaram no litoral uruguaio foram erodidas quase totalmente pela ação das ondas. A maior parte desse material foi retrabalhado e depositado por ondas e correntes ao longo do litoral, formando um cinturão arenoso. Parte destes sedimentos foi devolvida à costa em tempos mais modernos, formando campos de dunas que cobrem o embasamento ou as formações Cenozoicas continentais. Os sedimentos quaternários da costa do rio de la Plata exterior e litoral atlântico estendem-se quase ininterruptamente até o RS (Brasil),

onde são identificados com o nome de Formação Graxaim. Durante o Quaternário e Terciário, foram gerados numerosos ciclos marinhos (fases transgressivas-regressivas) abrangendo, contudo, um período muito mais curto. Universalmente são reconhecidos durante o Pleistoceno quatro ciclos glácio-eustáticos. Porém, devido à insuficiência de dados, só é possível reconstruir os eventos correspondentes ao Pleistoceno Superior e o Holoceno (última transgressão marinha). Durante a última glaciação o nível do mar chegou a ~170-180m abaixo do nível atual. Há aproximadamente 15 ka o mar iniciou sua subida até chegar a estabilizar-se em sua posição atual. Durante o Pleistoceno, o mar cobriu repetidas vezes a Plataforma Continental, as planícies costeiras e o vale do rio de la Plata, mas aparentemente nunca superou o limite interior da Planície Costeira (URIEN *et al.* 1980).

Durante os níveis mais baixos do mar, o rio de la Plata estendeu-se sobre a atual Plataforma Continental e implantou um sistema de canais fluviais. Estes paleocanais representam uma das feições topográficas mais notáveis na região. Existem outros rios menores que drenam as terras altas, que também se estenderam sobre a Planície Costeira submersa e chegaram inclusive ao bordo da plataforma (~17 ka). Estes rios, de modo semelhante ao rio de la Plata, também construíram deltas, muitos dos quais encontram-se atualmente sepultados pelos sedimentos transportados pelo mar durante seu avanço (URIEN *et al.* 1980).



Figura 11 – Mapa político do Uruguai (Disponível em <http://www.mapasdeluruguay.eluruguayo.com>).



Figura 12 – Mapa das lagunas costeiras do Uruguai (Extraído de TRIMBLE et al. 2010).

I.7. Contexto Genético

I.7.1. Marcadores moleculares no estudo de populações

O estudo da variabilidade genética (e de sua estruturação dentro e entre populações) através de técnicas moleculares, talvez seja a parte mais importante da Genética da Conservação, e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente como das espécies já ameaçadas de extinção. A estimativa da estruturação populacional é um passo importante em estudos de Genética da Conservação, pois permite direcionar os esforços de conservação para um uso mais eficiente dos recursos disponíveis (SOLÉ-CAVA 2004).

A estrutura populacional é composta por duas partes distintas inter-relacionadas: estrutura demográfica e estrutura genética. Ambas são determinadas não só pelas características populacionais, mas também por processos como mutação e fluxo gênico que aumentam a variabilidade genética, e deriva genética, seleção e endocruzamento responsáveis por perdas da variabilidade (MEFEE & CARROL 1997; AMOS & HARWOOD 1998). É essa variabilidade genética que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes, assim como o desenvolvimento de diversas metodologias de análise molecular que tem facilitado os estudos populacionais, bem como permitindo testar diferentes hipóteses evolutivas tanto intra como interespecíficas.

O mais importante, do ponto de vista da Genética da Conservação, é o fato de que marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, de modo que podemos estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (SOLÉ-CAVA 2004). Além disso, informações obtidas da análise de marcadores moleculares podem contribuir para uma melhor compreensão de relações evolutivas, e, entre outras coisas, fornecer aportes para o manejo de espécies e também

na sugestão de políticas de preservação nos seus estágios iniciais e mais simples, como na determinação de estruturas populacionais e na análise filogeográfica.

Estudos de filogeografia comparativa têm sido valiosos para o desenvolvimento e teste de hipóteses sobre processos evolutivos históricos com impacto na composição da biodiversidade atual. As metodologias que utilizam DNA são muito eficazes para reconstrução filogenética e têm sido largamente empregadas em várias abordagens evolutivas, tais como nos estudos de fluxo gênico, especiação, sistemática e estrutura de populações (AVISE 1994).

Em função do tipo (assim como do grau de refinamento) das análises genéticas, diferentes marcadores moleculares podem ser empregados. Entre eles destacam-se: as aloenzimas, estudos com RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequências de DNA mitocondrial, DNA *fingerprint* usando regiões de minissatélites, RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e polimorfismos em região de microssatélites (AVISE 1994).

1.7.1.1. O DNA Mitocondrial

Sequências nucleotídicas fornecem a mais alta resolução para o exame da evolução molecular em populações. O estudo das relações genealógicas entre indivíduos dentro de uma espécie requer sequências não-recombinantes e que evoluam rapidamente (alta taxa de mutação), tais como aquelas encontradas no DNA mitocondrial (mtDNA) (VIGILANTE *et al.* 1989).

O genoma mitocondrial dos animais é pequeno e relativamente uniforme em tamanho entre vertebrados e invertebrados (BROWN *et al.* 1979). Ele é haplóide, circular e varia entre 15.000 e 17.000 pares de bases de comprimento, estando presente em centenas e até milhares de cópias por célula (LI & GRAUR 2000). Tipicamente, o genoma mitocondrial consiste de 37 genes, funcionalmente distintos, sem grandes espaços intergênicos. Estes *loci* levam informação para 22 diferentes RNAs transportadores, dois RNAs

ribossomais e 13 RNAs mensageiros que codificam para diferentes subunidades polipeptídicas de proteínas envolvidas no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa que ficam na membrana interna da mitocôndria (AVISE 2000).

O mtDNA é simples em estrutura e econômico em tamanho (BROWN 1985), e evolui, em animais superiores, muito mais rapidamente do que o DNA nuclear cópia única (BROWN *et al.* 1979). As comparações entre as sequências de DNA de diferentes organismos revelam que a razão das substituições de nucleotídeos, durante a evolução, foi dez vezes maior em genomas mitocondriais do que em genomas nucleares, o que provavelmente é devido à reduzida fidelidade dos processos de replicação ou reparo do mtDNA, ou de ambos. Como só cerca de 16.500 nucleotídeos precisam ser replicados e expressos como RNAs e proteínas em mitocôndrias de células animais, a proporção de erro *por nucleotídeo* (copiado na replicação do DNA, mantido pelo reparo do DNA, transcrito pela RNA polimerase ou traduzido em proteínas pelos ribossomos mitocondriais), pode ser relativamente alta sem que haja danificação de qualquer um dos, relativamente poucos, produtos gênicos (ALBERTS *et al.* 2002).

A taxa relativamente alta da evolução dos genes mitocondriais torna as comparações das sequências de mtDNA úteis para estimar as datas de eventos evolutivos relativamente recentes, tendo sido amplamente utilizado em estudos de caráter evolutivo e filogenético (ALBERTS *et al.* 2002). O mtDNA é adequado para o estudo de baixos níveis taxonômicos como relações intra-genéricas ou intra-específicas devido a suas rápidas taxas de substituições de nucleotídeos (BONVICINO & MOREIRA 2001).

Estudos filogeográficos baseados em análises de DNA mitocondrial permitem o seguimento de rastros genealógicos além dos limites genéticos entre as populações, espécies e grupos taxonômicos mais elevados. O sucesso da filogeografia baseada no DNA mitocondrial foi devido à descrição aperfeiçoada da distribuição geográfica, das relações filogenéticas, das distâncias genéticas e tempos de divergência entre linhagens

evolutivas de animais; aumentando o conhecimento relativo à biogeografia e às áreas de endemismo (BERMINGHAM & MORITZ, 1998; DA SILVA & PATTON, 1998).

BROWN & WRIGHT (1975) publicaram a primeira análise significativa da variação do mtDNA na natureza em uma breve publicação científica sobre lagartos partenogenéticos. Este estudo foi o pioneiro de uma série de estudos que documentaram o poder da análise do mtDNA em decifrar as origens evolutivas e idades de numerosos táxons de vertebrados unissexuais (AVISE 2000). Diversos outros trabalhos sobre lagartos têm sido desenvolvidos utilizando o mtDNA como ferramenta de investigação (MACEY *et al.* 1997, 2000; RADTKEY *et al.* 1997; HARRIS *et al.* 1998; SCHULTE *et al.* 1998, 2000, 2003; CLARK *et al.* 1999; HICKSON *et al.* 2000; FU 2000; HONDA *et al.* 2000; PASSONI *et al.* 2000; BREHM *et al.* 2001, 2003; FROST *et al.* 2001; SURGET-GROBA *et al.* 2001; MAUSFELD *et al.* 2002; HOWER & HEDGES 2003; MORANDO *et al.* 2003, 2004, 2007, 2008; VICARIO *et al.* 2003; AVILA *et al.* 2004, 2006, 2008, 2009; JESUS *et al.* 2005; PELLEGRINO *et al.* 2005; TORRES-PÉREZ *et al.* 2007; VICTORIANO *et al.* 2008; SMITH *et al.* 2011).

O genoma mitocondrial é uma das “pedras-fundamentais” da moderna genética evolutiva e tem sido amplamente utilizado para reconstruir genealogias e descrever a estrutura genética de populações (GEMMELL *et al.* 2004). Comprovando a relevância e aplicabilidade desta abordagem, AVISE (2000) afirma que aproximadamente 70% dos estudos filogeográficos foram realizados através de análises de DNA mitocondrial. Também uma recente revisão sobre os atuais conhecimentos filogeográficos da América do Sul mostrou que 58% dos artigos filogeográficos publicados entre 1987 e 2011 utilizaram o DNA mitocondrial como marcador (TURCHETTO-ZOLET *et al.* 2012).

ZARDOYA & MEYER (1996) em trabalho sobre a performance filogenética dos genes mitocondriais codificadores de proteínas entre vertebrados, fizeram testes a fim de verificar se o desempenho superior de alguns genes era simplesmente devido ao seu comprimento. Os resultados indicaram que o desempenho de um único gene não era simplesmente relacionado ao seu tamanho, mas alguns genes parecem ser traçadores

consistentemente mais confiáveis da história evolutiva do que outros. Assim, verificaram que os genes mitocondriais codificadores de proteínas poderiam ser classificados em três grupos em termos de performance filogenética: bons (ND4, ND5, ND2, Cytb e COI), médios (COII, COIII, ND1 e ND6) e pobres (ATPase 6, ND3, ATPase 8 e ND4L).

Para a realização do presente trabalho foram escolhidos dois genes mitocondriais codificadores de proteínas como marcadores moleculares: o Citocromo b (Cytb) e o Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI).

Citocromo b (Cytb)

O citocromo *b* é um gene mitocondrial que faz parte da cadeia transportadora de elétrons (PALUMBI 1996). Foram feitos trabalhos a respeito da evolução deste gene em diferentes grupos de vertebrados, e, segundo PALUMBI (1996), alguns destes estudos notaram que o nível de conservação dos aminoácidos varia significativamente em diferentes partes do gene citocromo *b*. Existem diversas partes do gene que são altamente conservadas entre táxons e parecem ser importantes na função da proteína.

Diversos trabalhos utilizando o citocromo *b* como marcador molecular foram feitos com lagartos em diferentes níveis taxonômicos: gênero *Cnemidophorus* (RADTKEY *et al.* 1997), gênero *Sceloporus* (CLARK *et al.* 1999), Família Lacertidae (FU 2000), gênero *Mabuya* (BREHM *et al.* 2001; MAUSFELD *et al.* 2002; JESUS *et al.* 2005), gênero *Lacerta* (SURGET-GROBA *et al.* 2001; BREHM *et al.* 2003), Família Xantusiidae (VICARIO *et al.* 2003), gênero *Liolaemus* (AVILA *et al.* 2004, 2006, 2008, 2009; MORANDO *et al.* 2003, 2004, 2007, 2008; TORRES-PÉREZ *et al.* 2007; VICTORIANO *et al.* 2008), gênero *Gymnodactylus* (PELLEGRINO *et al.* 2005).

MORANDO *et al.* (2003 e 2004) sugerem que o marcador molecular *cyt b* foi suficientemente variável para estudos filogeográficos com o gênero *Liolaemus*. Experiências prévias dos mesmos pesquisadores com outros grupos de Squamatas

sugerem que este gene poderia ser o mais variável dentre três genes mitocondriais utilizados em outros trabalhos (Cyt *b*, ND4 e 12S).

Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI)

O Citocromo C Oxidase é um complexo enzimático componente da cadeia respiratória mitocondrial. Ele é o catalisador terminal desta cadeia, usando os elétrons que fluem através da cadeia para reduzir as moléculas de oxigênio à água (SARASTE 1990). As subunidades 1-3 formam o núcleo funcional do complexo enzimático. O COI é a subunidade catalítica da enzima.

O gene citocromo *b* tem sido mais comumente utilizado em análises filogenéticas, entretanto o uso do COI neste tipo de estudo vem ganhando destaque a partir das publicações de HEBERT *et al.* (2003a,b), os quais sugeriram que sequências do COI seriam capazes de identificar corretamente filos, ordens e espécies próximas de animais. Assim, foi proposta a construção de um banco de sequências de um grande número de organismos tendo o COI como gene de referência, ou seja, a sequência do COI seria usada como um código de barras (*barcode*) específico para cada espécie. Isso permitiria atribuir indivíduos desconhecidos a espécies e facilitar a descoberta de novas espécies (Hebert *et al.* 2003a).

Diversos trabalhos utilizando o COI juntamente com outros marcadores moleculares foram desenvolvidos com lagartos em diferentes níveis taxonômicos: lagartos iguanídeos e acrodontes (MACEY *et al.* 1997, 2000; SCHULTE *et al.* 1998, 2003), gênero *Liolaemus* (SCHULTE *et al.* 2000), família Lacertidae (FU 2000), gêneros *Gonatodes* e *Kentropyx* (SOUZA 2008), lagartos agamídeos (SMITH *et al.* 2011).

1.8. Áreas de ocorrência de *Liolaemus*

Uma característica marcante na paisagem das regiões de ocorrência de algumas espécies arenícolas do gênero *Liolaemus* é a fragmentação e a perda do habitat devido, principalmente, à atividade antrópica. As áreas de distribuição que se estendem atrás da primeira linha de dunas são atualmente raras e/ou modificadas, ocasionando o isolamento de pequenas populações ou levando as pequenas populações de *Liolaemus* a uma paisagem de dunas fragmentadas.

A zona costeira do Brasil mostra progressiva concentração e diversificação das atividades humanas e já demonstra comprometimento dos recursos naturais e ecossistemas. No Rio Grande do Sul as formações de dunas e restingas presentes na Planície Costeira constituem uma paisagem natural cada vez mais rara, apesar de serem consideradas de preservação permanente (Lei Federal nº. 4771 de 15 de setembro de 1965 e Resolução nº 4 de 18 de setembro de 1985 do Conselho Nacional do Meio Ambiente). Nos últimos anos, os ecossistemas de dunas e restingas litorâneas do RS, seja na costa Atlântica ou na zona de praias da Laguna dos Patos e Mangueira, vêm sofrendo alterações resultantes de ações antrópicas. Entre os impactos negativos sobre estas formações destacam-se o aumento indiscriminado dos loteamentos em balneários, a retirada de areia e a contaminação do solo e dos principais corpos d'água (MELAMED & VERRASTRO 1997). Esses fatores, além de modificarem a paisagem, têm reflexos diretos sobre a fauna da região. Um exemplo destes reflexos é a classificação de *L. occipitalis* como espécie Vulnerável para o RS e SC (FONTANA *et al.* 2003; IBAMA 2003; IUCN 2012; Resolução CONSEMA Nº. 002 de 06 de dezembro de 2011), tendo este último estado também sofrido grandes pressões antrópicas em sua costa. A classificação de *Liolaemus arambarensis* como Ameaçada (IUCN 2012), e sua inclusão como espécie Ameaçada na Lista das

Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul 2013 (em preparação) também é um reflexo da pressão antrópica sobre os habitats costeiros.

A ocupação antrópica em Áreas de Preservação Permanente (APPs) e/ou de risco, como no caso das dunas frontais, tem levado a situações de confronto social e jurídico. A base legal do Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro II (PNGC) foi regulamentada pelo Decreto Nº 5.300 de 7 de dezembro de 2004, que estabelece critérios de gestão da orla marítima. Mesmo assim, os interesses econômicos e a pressão pelo uso e ocupação destas áreas geram conflitos entre as funções ecológicas e sócio-culturais. Planos de Manejo de Dunas são exigências legais do órgão ambiental estadual (FEPAM) às Prefeituras Municipais, com o objetivo de proteger o ambiente natural e reduzir os impactos frente à urbanização e os interesses de diferentes agentes sociais no espaço litorâneo. Configuram-se em importantes instrumentos de conservação, destacando formas de utilização adequada e estabelecendo normas para a recuperação de dunas e da vegetação nativa (GRUBER *et al.* 2010).

Em relação às áreas com vegetação de restinga arenosa, VINCIPROVA & VERRASTRO (2001) afirmam que elas possuem particularidades muito significativas, tanto em nível florístico, quanto faunístico e paisagístico. Devido à natureza relativamente recente dos habitats de restinga, a taxa de endemismos entre as espécies de répteis é relativamente baixa, especialmente se comparada com as encontradas em outros habitats como os da Mata Atlântica (ROCHA *et al.* 2000). Apesar do baixo endemismo, temos no Brasil duas espécies do gênero *Liolaemus* endêmicas de áreas de restinga: *Liolaemus lutzae* e *L. arambarensis*, já citadas anteriormente com suas respectivas áreas de distribuição.

No tocante a estas áreas de restinga, conflitos de gestão vêm ocorrendo no Brasil, discutindo a pertinência da Resolução 303/2002 do CONAMA - APP de Restinga, que configura “um limite de NÃO ocupação para áreas urbanizadas de 60m e NÃO urbanizadas de 300m a partir do sopé da duna frontal”. Tal resolução e seus limites provocam debates técnicos e jurídicos acirrados. Válida para todos os segmentos do

litoral, esta Resolução encontra distintas interpretações, na Geologia, Geomorfologia, Biologia, Ecologia e Direito. Ainda, se, em análise geológica de escala local, o setor costeiro NÃO se configure como APP de Restinga, existem diferentes leituras da Biologia e Ecologia, em que a vegetação de Restinga deve ser preservada. O Resultado de muitos desses conflitos têm sido de Ação Civil Pública e paralisa nos processos de planejamento e empreendimentos no litoral, que carecem de análise integrada local/regional para regulamentação técnica e normativa, na escala do município (GRUBER *et al.* 2010).

Assim como as duas espécies de *Liolaemus* ocorrentes no sul do Brasil, *L. wiegmanni* também tem suas populações ameaçadas tanto no Uruguai quanto na Argentina. Segundo KACOLIRIS *et al.* (2006), que verificaram a ocorrência de *L. wiegmanni* em diferentes habitats de remanescentes das dunas costeiras da província de Buenos Aires, a costa bonaerense, incluída na região da Argentina Pampeana, tinha uma alta diversidade de habitats naturais, dos quais existem atualmente apenas alguns remanescentes, e não há um plano de gestão sustentável para estas áreas.

A Argentina atravessou nos últimos anos um pico imobiliário, acompanhado de um crescimento nas áreas urbanas e um incremento no uso dos recursos naturais. Como resposta a este efeito, os ambientes costeiros naturais são alterados cada vez em maior magnitude (MARCOMINI & LÓPEZ 2010). As cidades mais importantes, mais populosas e com a maior atividade turística da Argentina encontram-se nas zonas costeiras de Buenos Aires. As principais causas das alterações na dinâmica costeira do litoral bonaerense, e seus consequentes impactos ambientais e conflitos de interesses associados, são as ações relacionadas com as atividades portuárias, minerais, imobiliárias e recreativas (LÓPEZ & MARCOMINI 2010). As principais causas da fragmentação e perda de habitats nas dunas costeiras argentinas são: o desenvolvimento urbano, o inadequado manejo das praias arenosas, a extração de areia para a construção, a utilização de plantas exóticas para a contenção das dunas, e o trânsito de motocicletas e veículos (ISLA & GAIDO 2001); basicamente as mesmas que afetam as dunas brasileiras. Essa fragmentação de habitats,

juntamente com as atividades humanas nas dunas costeiras, podem ter um efeito negativo sobre espécies sensíveis, como por exemplo, os lagartos de dunas, com um consequente decréscimo da biodiversidade (VEGA *et al.* 2000).

Os resultados de outro estudo realizado nas dunas costeiras da Argentina também refletem as alterações ambientais no local. Foi demonstrado que as diferenças encontradas entre as espécies *Liolaemus multimaclatus* e *L. gracilis* BELL 1843 antes e depois da construção de uma rodovia estiveram claramente ligadas à perda de habitat e que, o impacto humano na estrutura dos habitats de dunas, induziu mudanças na assembléia de lagartos, incluindo mudanças na abundância relativa das espécies e no uso proporcional de seus microhabitats preferidos (VEGA *et al.* 2000).

As populações costeiras de *L. wiegmannii* no Uruguai também sofrem com as alterações ambientais em suas áreas de ocorrência. Os ecossistemas da costa uruguaia são a base de atividades de enorme importância social e econômica para o país: pesca, turismo, navegação, assentamentos urbanos e industriais. Devido a isto estão submetidos a um enorme impacto antrópico. Nos últimos dez anos foi registrado um impactante crescimento populacional na costa, com crescente aumento no número de assentamentos irregulares. O desenvolvimento das zonas litorâneas vem potencializando uma acentuada deterioração ambiental dos ecossistemas marinhos e costeiros. As principais pressões destas regiões são a alteração do hábitat por agentes contaminantes e a exploração dos recursos. Existem importantes fenômenos de erosão, extração irregular de areia, ou interferência em processos naturais de transporte de sedimentos em pelo menos 40 praias da costa. Sendo que o crescente distúrbio do hábitat ameaça a biodiversidade, já existindo áreas críticas por seu grau de contaminação (CLAES/PNUMA/DINAMA 2008).

Um estudo ambiental nacional (OPP-BID 1992) apontou a costa oceânica como um ecossistema valioso, altamente vulnerável e muito modificado, sendo uma área prioritária para proteção. Os três fatores apontados na época como ameaça e que atuam como

elementos modificadores dos ecossistemas costeiros naturais são: a construção de portos, o turismo, e, novamente, a crescente urbanização; basicamente os mesmos dos dias atuais. O estudo também ressalta que são escassas as áreas que mantêm suas características originais com modificações menores, tais como costas isoladas que se encontram, sobretudo, no litoral atlântico do Departamento de Rocha. A zona costeira do Departamento de Rocha é a que mantém maiores valores naturais e paisagístico, sendo necessária sua conservação por sua diversidade taxonômica e condição de recurso natural. É na costa do Departamento de Rocha que temos a ocorrência de populações de *L. occipitalis* e de algumas populações de *L. wiegmanni*, sendo necessária a proteção dessa região, devido às ameaças sofridas atualmente pelas duas espécies (OPP-BID 1992).

No Uruguai ainda não há um marco institucional e legal específico com relação às zonas costeiras, embora existam normas e instituições relacionadas com seu manejo. Além disso, o Projeto de Lei de Ordenamento e Desenvolvimento Territorial Sustentável estabelece em seu artigo 10 a elaboração das Diretrizes Nacionais do Espaço Costeiro. Estas diretrizes são fundamentais para estabelecer mecanismos de coordenação interinstitucional e harmonização, adequados para contribuir à melhor aplicação das estratégias para a proteção dos recursos costeiros nacionais (CLAES/PNUMA/DINAMA 2008).

De forma geral, o descrito por GRUBER *et al.* (2010) sobre as pressões antrópicas sofridas pela costa gaúcha, também se aplica às demais áreas costeiras habitadas pelas três espécies alvo deste estudo. Os pesquisadores ressaltam que o ambiente de barreira arenosa suporta a mancha urbana e sofre com processos de impermeabilização, mau manejo de dunas e da orla marítima, além de contaminação por esgotos domésticos, de grande difusão no lençol freático. Os terraços lagunares, ambientes planos e de sedimentos areno-lamosos, abrigam lagos costeiros que suportam atividades agrícolas e de turismo e urbanização, além de eventuais atividades de mineração de areia e

destinação de resíduos sólidos. Tais ambientes vêm sofrendo com impacto da urbanização e progressiva contaminação dos recursos hídricos. O avanço da urbanização sobre setores de orla traz consequências pela impermeabilização do solo, processo de verticalização, vulnerabilidade de dunas frontais e sangradouros poluídos, com o comprometimento de segmentos de praia, em sua balneabilidade e atividade erosional. Ainda, ilhas de calor, sombreamento sobre a praia emersa, corredores de vento, são impactos observados pela intensa ocupação de edifícios.

II. Objetivos

- Caracterizar as espécies *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmanni* no que se refere à variabilidade genética e diferenciação geográfica (padrões filogeográficos) através da utilização de dois marcadores moleculares mitocondriais: Citocromo *b* (Cytb) e Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI);

- Examinar a concordância entre os padrões filogeográficos encontrados a partir dos dados moleculares e a formação geológica das respectivas áreas de ocorrência de cada uma das espécies;

- Ampliar o conhecimento sobre as espécies *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmanni*, e corroborar com possíveis estratégias de preservação destas e de seu entorno.

III. Capítulos

III.1. Capítulo I

PHYLOGEOGRAPHY OF *LIOLAEMUS OCCIPITALIS* (SAND LIZARD): AN APPROACH BASED ON MITOCHONDRIAL
DNA

*Caroline Maria da Silva¹, Gabriela P. Fernández², Thales R.O. de Freitas³ & Laura Verrastro¹

¹ Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43.435, CEP: 91.501-970, Bairro Agronomia, Porto Alegre/RS – Brazil. Phones: 55 (51) 3308-7716/3308-7717; Fax: 55 (51) 3308-7696. E-mail: carol_poabr@yahoo.com.br; lauraver@ufrgs.br

² Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Agrobiología. Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). Ruta 32 Km 4,5 Pergamino, Buenos Aires, Argentina. E-mail: gabriela.fernandez@nexo.unnoba.edu.ar

³ Laboratório de Citogenética e Evolução, Depto. de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43.323, CEP: 91.501-970, Bairro Agronomia, Porto Alegre/RS – Brazil. Phones: 55 (51) 3308-6733; Fax: 55 (51) 3319-7311. E-mail: thales.freitas@ufrgs.br

* Corresponding author

Artigo a ser submetido ao periódico *Zoological Journal of the Linnean Society*

ABSTRACT

The more than 231 species of lizards of the genus *Liolaemus* are endemic to temperate South America. *Liolaemus occipitalis* BOULENGER, 1885 occurs in the coastal sand dunes of southern Brazil, in the states of Rio Grande do Sul and southern Santa Catarina, and on the coast of Uruguay, Rocha Department, from Barra del Chuy to the west side of the Valizas Creek. In this study we used concatenated sequences (1291 base pair) of the mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) and Cytochrome *b* (Cyt *b*) to investigate the phylogeographical pattern of *L. occipitalis*. Our results suggest that *L. occipitalis* has a complex pattern of occupation within its distribution, showing signs of recent population expansion only to the south of the Mapituba River, where haplotypes are probably the remnants of a larger gene pool. The insular populations from Santa Catarina have obvious signs of genetic isolation, and can be considered an important source of genetic diversity for the species.

Keywords: genetic diversity, haplotypes, mtDNA

INTRODUCTION

Assessment of the geographical distribution of genetic variability within each species is centrally important in conservation and management programs, because it allows the identification of geographical areas where interchange among individuals is limited. This results in independent evolutionary lineages, and enables the identification of priority areas for monitoring, management and protection (Avice, 1994; Moritz & Faith, 1998; Taylor & Dizon, 1999).

The genus *Liolaemus* (Liolaemidae (Frost *et al.*, 2001)) is distributed from the central coast of Peru southward through Bolivia, Paraguay, Chile and Argentina, reaching the east coast of Uruguay and south and southeast Brazil (Etheridge & Espinoza, 2000). *Liolaemus occipitalis* is a small lizard that inhabits the coastal sand dunes of the extreme southern part of Brazil, in the states of Rio Grande do Sul (RS) and Santa Catarina (SC) (Lema, 1994; Peters, Orejas-Miranda & Vanzolini, 1986; Verrastro, 1991; Verrastro & Bujes, 1998; Verrastro & Krause, 1999), and on the coast of Uruguay, in the Department of Rocha, from Barra del Chuy to the west side of the Valizas Creek (Valizas) (Verrastro, Schossler & Silva, 2006) (Figure 1).

Severe reduction of distribution areas caused by fragmentation due to human activity is a threat faced by many species (Fernández-Stolz, Stolz & Freitas, 2007; Gaines *et al.*, 1997; Isla & Gaido, 2001; Kacoliris, Horlent & Williams, 2006; Vega, Bellagamba & Fitzgerald, 2000). In both Brazil and Uruguay, the area of occurrence of *L. occipitalis* is an increasingly rare natural landscape, highly vulnerable and heavily modified by anthropic activity (Dillenburg *et al.*, 2000; Esteves *et al.*, 2002; Tomazelli & Villwock, 2000). One result of these environmental alterations is the isolation and/or disappearance of natural *L. occipitalis* populations; therefore, the species is classified as Vulnerable in RS and SC (Fontana, Bencke & Reis, 2003; IBAMA, 2003; IUCN, 2012; Resolução CONSEMA N°. 002 de 06 de dezembro de 2011).

Liolaemus occipitalis occurs in a recent geologic unit whose formation might have influenced its evolutionary history. The recent geologic history of the area of occurrence of *L. occipitalis* was mostly influenced by a series of sea-level changes in the Pleistocene and Holocene which led to the deposition of marine sediments in different epochs and to the formation of a series of coastal lagoons which can act as barriers to gene flow in coastal species (Dillenburg & Hesp, 2009). The largest geomorphological domain in this region is the Coastal Plain of the RS state (CPRS), which spans from the Laguna bar, in SC state, to the Polonio Cape in Uruguay, and which has been formed in four major cycles of sea-level changes since the Middle Pleistocene (~400 thousand years ago, kya) (Villwock & Tomazelli, 1995; Tomazelli & Villwock, 2005).

Considering the lack of genetic information for *L. occipitalis* and the need for actions to promote its conservation, we examined the genetic diversity, the phylogeographical structure, and the congruence (or lack of) between the patterns found and the geological evolution of its range based on fragments of the mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 and Cytochrome *b*.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Samples were collected for 18 different localities (n = 103) throughout the occurrence area of *L. occipitalis* (Figure 1, Table 1). Each sampling locality was considered as a population. The tissue samples from the specimens used in this study are deposited in the tissue collection of the Herpetology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGST), Porto Alegre, Brazil.

Molecular Methods

Genomic DNA was extracted from muscle and/or liver tissue using salting-out precipitation following Medrano, Aasen & Sharrow (1990). A fragment of ~617 base pairs

(bp) of the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) was amplified via PCR in a cocktail containing 1 μ L of diluted total DNA (1:10), 1X PCR buffer, 1.5mM of MgCl₂, 0.2 μ M of dNTP, 0.2 μ M of each primer and 0.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The primers used were: COI-L1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') and COI-H2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Amplifications were performed according to the following conditions: initial denaturation at 94°C for 1min, followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 47°C for 1min 30 sec, extension at 72°C for 1min, and final extension at 72°C for 5min. Two separate fragments of ~430 bp and ~730 bp of the mitochondrial gene Cytochrome b (Cytb) were also amplified separately via PCR in a cocktail containing 1 μ L of total DNA, 1X PCR buffer, 4.0mM of MgCl₂, 0.4 μ M of dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The primers used were: the light strand primers GLUDGL (5'-TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG-3'; Palumbi, 1996) and cyt-b 1 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'; Kocher *et al.*, 1989), and the heavy strand primers Primer 3 (5'-GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC-3'; Palumbi, 1996) and Primer 2 (5'-CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA-3'; Palumbi, 1996). Amplifications were performed according to the following conditions: initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by 33 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 50°C for 30 sec, extension at 72°C for 45 sec, and final extension at 72°C for 5 min. PCR products were purified using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Invitrogen) following the guidelines of the supplier and sequenced in an ABI Prism 3100 (Applied Biosystem) automated sequencer at Macrogen Inc. (South Korea).

Data Analysis: Molecular Diversity, Population Structure and Demographic Analysis

Sequences were aligned using the program MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) using the algorithm of the program Muscle (Edgar, 2004) in the standard configurations. The final edition of concatenated genes (COI and Cytb) originated a single sequence of 1291 bp per individual. Sequences were deposited in GenBank (Accession Number: XXXXXXXX).

The haplotypes was characterized with the program DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). Measurements of genetic variability in the sampled populations (haplotypes and absolute frequency $H(\text{freq})$, number of polymorphic sites (S), haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (π)) and estimates of population divergence (Φ_{ST}) were calculated with the program ARLEQUIN 3.0 (Excoffier, Laval & Schneider, 2005).

The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (program ARLEQUIN) was performed to estimate the genetic variability partition and to test if the existing geographical barriers provide a good explanation for the genetic divergence observed in *L. occipitalis*. With this purpose, two analyses were performed: (1) considering all the populations subdivided in seven groups, taking into account the existing natural geographical barriers separating these groups (Atlantic Ocean [A], bar of Laguna [B], Araranguá River [C], Mampituba River [D], Tramandaí River [E] and bar of Rio Grande [F] (Figure 1); (2) considering all populations subdivided into four groups obtained through a Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA) (Dupanloup, Schneider & Excoffier, 2002) and a Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS ver. 5.3) (Corander, Sirén & Arjas, 2008).

We also implemented neutrality tests Fu's F_s (Fu, 1997) and Tajima's D (Tajima, 1989) with the program ARLEQUIN and performed Mismatch Distribution analyses with program DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009).

To test the correlation between genetic and geographical distances (isolation by distance; Slatkin, 1993), we implemented the Mantel test (Mantel, 1967) with the program Alleles In Space 1.0 (Miller, 2005). Statistical significance was tested using 1000 replications.

Populations with less than five sampled individuals were excluded from the measurements of genetic variability, Φ_{ST} , AMOVA, and from the population expansion analysis.

Data Analysis: Molecular Phylogeny

Haplotype relationships were estimated through haplotype networks generated according to the Median-Joining algorithm (Bandelt, Forster & Röhl, 1999) (program NETWORK 4.5.1.6: <http://www.fluxus-technology.com/sharenet.htm>).

For phylogenetic reconstructions, Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods were applied using the programs TNT 1.1 (Goloboff, Farris & Nixon, 2008), RAxML 7.0.3 (Stamatakis, 2006) and MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), respectively. The MP tree was reconstructed from 10 Wagner trees using the tree-bisection reconnection (TBR) as the swap algorithm. A consensus tree was obtained from the generated trees, in which the bootstrap values obtained were inserted (100 replicates). The ML tree reconstruction was based on the evolution model GTRGAMMA (program default). One hundred Wagner trees and 1000 bootstrap (Standard Bootstrap) replicates were generated; the bootstrap values were added to the best likelihood tree. The BI tree reconstruction was based on the evolution model INVGAMMA (GTR model with gamma-distributed rate variation across sites and a proportion of invariable sites), and 5×10^6 generations were run in a 5×10^5 generation burn-in.

According to ALFARO *et al.* (2003), the Bayesian Posterior Probability (PP) is a better estimation accuracy of the ratios of values for bootstrap support above 50%. Thus, the 70% PP is likely to correspond to an accuracy of approximately 70%, while the proportion of 70% bootstrap is often close to an accuracy of 95%. In this paper we consider PP values greater than 0.9 as strong and below it, weak or moderate, and bootstrap values greater than 80% as strong and below it, moderate or poor.

The following species were used as outgroups: *L. arambarensis* (GenBank: XXX); *L. wiegmannii* (GenBank: XXX); *L. lutzae* (GenBank: XXX); *L. multimaculatus* (GenBank: XXX); *L. scapularis* (GenBank: XXX); *Phymaturus* (GenBank: XXX).

RESULTS

Molecular Diversity, Population Structure and Demographic Analysis

For the sequenced 1291 bp of the concatenated mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 and Cytochrome b of *L. occipitalis* ($n = 103$), 42 haplotypes were found (H1 – H42) (Table 2). Measurements of genetic variability of the *L. occipitalis* populations sampled are summarized in Table 2. Nine of the 16 populations with more than one individual sampled were monomorphic or showed only two different haplotypes. The other populations showed from three to eight different haplotypes. Populations between Cidreira and Rio Grande had the highest values of haplotype diversity ($H_d > 75\%$) (Table 2). Regarding the nucleotide diversity (π), the highest values were found in the populations between Torres and Taim (Table 2).

The genetic divergence between *L. occipitalis* populations was also estimated using the Φ_{ST} values (Table 3). Pairwise comparisons of these Φ_{ST} values showed that most of the populations had significant differences, suggesting a reduced genetic flow between them. The lower and non-significant values of Φ_{ST} occur among populations Torres, Mostardas, São José do Norte and Rio Grande (group III defined by SAMOVA and BAPS) (Table 3).

The AMOVA test showed that a statistically significant amount of molecular variance could be attributed to each level tested (among groups, among populations within groups, and within populations; Table 4). The greatest source of variability, four either seven groups, was found in the most inclusive hierarchical level (among groups). However, when populations were organized into four groups, not taking into consideration geographical barriers between them (Group I: Ingleses Beach, Joaquina Beach; Group II: Farol de Santa Marta, Morro dos Conventos; Group III: Torres, Mostardas, São José do Norte, Rio Grande; Group IV: Garopaba, Cidreira, Taim, Santa Vitória do Palmar), the proportion of variance explained by this population arrangement was higher (68.03%) than when organized in seven groups (40.65%), taking into account the barriers between them (Group I: Ingleses

Beach, Joaquina Beach; Group II: Garopaba; Group III: Farol de Santa Marta; Group IV: Morro dos Conventos; Group V: Torres; Group VI: Cidreira, Mostardas, São José do Norte; Group VII: Rio Grande, Taim Santa Vitória do Palmar) (Table 4).

The Mantel test detected a significant and positive correlation between genetic and geographical distances for all analyses performed. The correlation coefficient shown by all populations throughout the sampling area was relatively low ($r = 0.348$), and the one including populations from Rio Grande do Sul and Uruguay was very low ($r = 0.159$). On the other hand, the coefficient of populations from Santa Catarina was high ($r = 0.820$). These results indicate that gene flow among the *L. occipitalis* populations showed an overall isolation by distance pattern, which was most intense among populations from SC (Table 5).

Regarding haplotype relationships obtained from the network (Figure 2), the most outstanding characteristic was the presence of four haplotype groups. The first is composed of haplotypes exclusive to Santa Catarina Island populations (Inglese Beach, Joaquina Beach and Campeche Beach: haplotypes 1-4), and the second by haplotypes exclusive to two Santa Catarina continental populations (Farol de Santa Marta and Morro dos Conventos: haplotypes 6-10). The other two groups are composed of haplotypes from Rio Grande do Sul and Uruguayan populations. The first is characterized by the presence of one central and most frequent haplotype (H23), and from which less-frequent haplotypes derive. The second is characterized by the presence of two central and most frequent haplotypes (H16 and H36), from each of these haplotypes, less-frequent haplotypes derive. Thus, H23, H16 and H36 show a high probability of representing ancestral haplotype variants. The H23 group includes haplotypes exclusive to populations from RS, and most individuals carrying these haplotypes are found among the Mostardas and Rio Grande populations (24 individuals); only five individuals belong to the Torres population, on the border of RS and SC, and one to the Taim population. The H16-H36 group is formed by haplotypes dispersed over the CPRS and the area occupied by the species in Uruguay

(from Torres to Valizas). The only haplotype shown by the population of Garopaba (SC) is separated of this group by only three polymorphic sites.

Historic population dynamics

Different tests were performed in order to test the hypothesis of a demographic expansion among *L. occipitalis* populations. The analysis of all populations considered together showed non-significant values, as well as SC populations. However, the analysis of RS grouped populations showed a significant value for $F_u' F_s$ (Table 6). When analyzed separately, only three populations from RS showed significant values for Tajima's *D*: Mostardas (-1.831, $p < 0.05$), São José do Norte (-1.730, $P < 0.05$) and Taim (-2.019, $P < 0.05$). However, for $F_u' F_s$ only the Mostardas population showed significant value (-2.732, $P < 0.05$) (data not shown). The analysis of the groups resulting from the programs SAMOVA and BAPS showed that only Group III (Torres, Mostardas, São José do Norte, Rio Grande) has demographic expansion signs. The same occurs for both RS haplotype groups (Groups 1 and 2; Table 6), which also showed population-expansion signs. The population-expansion hypothesis for both haplotype groups was also supported by the Mismatch Distribution analysis, which showed a unimodal distribution for groups H23 (Figure 3a) and H16-H36 (Figure 3b). Results from Mismatch analysis for populations from SC were concordant with results of the Neutrality Tests, rejecting the expansion hypothesis (Figure 3c).

Molecular Phylogeny

The two haplotype clades from SC, congruent with the haplotype groups represented in the network (Figure 2), were recovered by all phylogenetic reconstructions with high support values: island clade (IB – 0.92 PP; ML – 95% bootstrap; MP – 93% bootstrap) and continental clade (IB – 0.98 PP; ML – 84% bootstrap; MP – 83% bootstrap) (Figure 4). The other two haplotype clades congruent with the haplotype clades represented in the

network (groups H23 and H16-H36; Figure 2) were also recovered by almost all phylogenetic reconstructions. The group H23 was recovered with high support value by IB tree (0.94 PP), and with lesser support values by ML and MP trees (75% and 78% bootstrap, respectively). The group H16-H36 show high statistical support in IB tree (0.96 PP), and appears as a weakly supported clade in ML tree (53% bootstrap). However, this group was partially recovered by MP tree with a low statistical support (sub-group H36, 51% bootstrap), and the sub-group H16 is shown as a polytomy (data not shown) (Figure 4).

DISCUSSION

Taken as a whole, our results suggest a complex occupation pattern of *L. occipitalis* in its distribution area, with signs of recent population expansion to the south of the Mampituba River [D] (Figure 1).

When all populations were considered together, the AMOVA showed that the greatest source of variability was between groups, regardless of their organization (Table 4). However, these results showed weak support for the relationship between the partitioning of the haplotype variability and extant geographical barriers between the population groups. This is also suggested by the high proportion of variability explained by the divergence between populations belonging to the same group when these were defined in terms of hypothetical geographical barriers (37.11%). The proportion of variance explained by the haplotype divergence between populations belonging to groups defined by SAMOVA/BAPS was considerably lower (12.11%).

Our results show no relationship between population structure and extant geographical barriers in the occurrence area of *L. occipitalis*, evidenced by the haplotype relationships found (Figure 2); and shared haplotypes from the southern bank of the Mampituba River (Torres) to the southern limit of the species' distribution (Valizas) (Figure 1 and Figure 2) can be observed. Populations from the south of the Mampituba River comprise two haplotype groups, which probably represent haplotypes that are remnants

of a larger gene pool, and that apparently evolved simultaneously. Both groups show clear indication of population expansion, as evidenced in several of the analyses (Table 6, Figure 2 and Figures 3a, 3b). The population group from the north of the Mampituba River (SC) does not show these same signs of expansion (Table 6, Figure 2 and Figure 3c).

One possible hypothesis to explain this situation is that, in the beginning, due to demographic factors (founder effect and subsequent dispersal), all individuals had the same, or the same few, existing haplotypes. From these first individuals, the genetic variability and geographical distribution observed today would have arisen. These were possibly molded, among other factors, by the geological evolution of the Coastal Plain of RS and SC.

The high diversity shown by the populations from central RS (Table 2) could be an indication that this region is an expansion center. The haplotypes H23, H16 and H36 are very likely to be ancestral, due to their relative high frequency in this region and also because many other haplotypes derived from them are currently scattered over the Coastal Plain of RS and Uruguay.

The lack of shared haplotypes between populations north and south of the Mampituba River and the high and significant Φ_{ST} values among them suggest that this is a barrier that influenced the genetic structure observed in *L. occipitalis* populations. However, south of the Mampituba River, the lower and non-significant values of Φ_{ST} among populations Torres, Mostardas, São José do Norte and Rio Grande (group III defined by SAMOVA and BAPS), support the hypothesis of lack of relationship between population structure and extant geographical barriers in the occurrence area of the species (Table 3). As for the insular populations from SC, the genetic isolation is evident in several of the analyses (Table 3, Figure 2 and Figure 4); therefore, the Island of SC can be considered a different genetic lineage of the species. In general, our results suggest that populations from the Island of SC can be considered an independent evolutionary group, because they show highly significant Φ_{ST} values (Table 3), arise as a strongly supported

clade in three phylogenetic reconstructions (Figure 4), and are an isolated group that does not share haplotypes with continental populations (Figure 2).

The low diversity values observed in the populations from SC (Table 2) may be related to the intense human development on the coast of this state, both on the continent and on the Island of SC, although the hypothesis of a recent occupation by the species cannot be discarded. The most plausible explanation for the low diversity of the populations from extreme southern RS is a recent occupation, since human occupation on this part of the coast of RS is less intense than on the coast of SC. According to Esteves *et al.* (2002), the southern sector of the southern Brazilian coast, from the entrance of the Laguna dos Patos to the Chuí Creek, is a 225 km-long coastline with only 7.6 kilometers of urbanized beaches. Although few individuals have been collected, the absence of variability shown by the Uruguayan *L. occipitalis* populations seems to be caused by a combination of two factors: the recent occupation by the species and the intense human activity in the area.

Many of the areas where *L. occipitalis* populations are found are disappearing under a rising wave of urbanization. Brazilian populations from Tramandaí and Torres (RS) have practically disappeared, generating discontinuities in the species' geographical distribution. According to Esteves *et al.* (2002), a new trend toward human occupation on the coast of RS is evident, and underdeveloped areas will probably be replaced by future settlements. Populations of *L. occipitalis* from Uruguay also face serious threats due to the impact of human population growth in the past decade on the coast (CLAES/PNUMA/DINAMA, 2008). Under this scenario, the loss of sand-dune habitats will in the future have a tremendous impact on *L. occipitalis* in terms of loss of genetic diversity and the risk of local extinctions. To avoid unplanned development along the coastal sections, it is necessary to identify these threatened areas.

Studies on other species that occur in the same area as *L. occipitalis* also demonstrate the alarming state of these species' conservation. Research on the subterranean rodent *Ctenomys flamarioni* (Fernández-Stolz *et al.*, 2007), which is restricted to the coastal dunes

of RS, indicate that the populations occupying the most altered environments show genetic signs of recent reduction in population size. Even if populations were suffering loss of genetic variability due to the natural instability of the coastal region, the impact produced by human activity could be acting synergistically with environmental factors, both current and historical, on the demographic characteristics of this species (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). A study on a species of petunia (*Calibrachoa heterophylla*) demonstrated the absence of this species in regions where its occurrence was expected; also, small populations were found in the most anthropically impacted coastal areas, as well as in protected areas (Mäder, 2008).

Some of the factors that may have helped to shape the current distribution of the genetic variability observed in *L. occipitalis* were the population expansions, the several cycles of marine transgressions-regressions, the existence of paleochannels along the occurrence area of the species, genetic drift, and population isolations, among others. Added to these factors, human actions are likely also affecting the evolutionary scenario for the species.

The development of coastal zones has exacerbated the environmental degradation of marine and coastal ecosystems. The anthropic pressure in coastal areas that are being rapidly urbanized is increasing geometrically, endangering the entire balance of a delicate environment and other living beings associated with it.

It is expected that the results of this and future studies, added to previous knowledge about the life history of *L. occipitalis*, will provide support for the development of management plans for the conservation of this endangered species and its increasingly impacted habitat.

FUNDING

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) with a PhD scholarship granted to C.M da Silva and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (proc. 479412/2008-1, coordinated by Luiz R. Malabarba).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the colleagues and technical laboratories of Herpetology and Molecular Biology, Department of Zoology, UFRGS, and Cytogenetics Laboratory, Department of Genetics, UFRGS; and the staff of the Postgraduate Program in Animal Biology, UFRGS.

REFERENCES

- Alfaro ME, Zoller S, Lutzoni F. 2003. Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. *Molecular Biology and Evolution* 20: 255–266.
- Avise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- CLAES (Centro Latinoamericano de Ecología Social), PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente). 2008. *Geo Uruguay: Informe del estado del ambiente*. Montevideo: Gráfica Mosca.
- Corander J, Sirén J, Arjas E. 2008. Bayesian Spatial Modelling of Genetic Population Structure. *Computational Statistics* 23: 111-129.

- Dillenburg SR, Roy PS, Cowell PJ, Tomazelli LJ. 2000. Influence of antecedent topography on coastal evolution as tested by the Shoreface Translation-Barrier Model (STM). *Journal of Coastal Research* 16: 71-81.
- Dillenburg SR, Hesp PA. 2009. *Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2471-2581.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Esteves LS, Toldo Jr. EE, Dillenburg SR, Tomazelli LJ. 2002. Long- and Short-Term Coastal Erosion in Southern Brazil. *Journal of Coastal Research* 36: 273-282.
- Etheridge R, Espinoza RE. 2000. Taxonomy of the Liolaeminae (Squamata: Iguania: Tropiduridae) and a semi-annotated bibliography. *Smithsonian Herpetological Information Service* 126: 1-64.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, Freitas TRO. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88: 935-945.
- Fontana CS, Bencke GA, Reis RE. 2003. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Frost DR, Etheridge R, Janies D, Titus TA. 2001. Total Evidence, Sequence Alignment, Evolution of Polychrotid Lizards, and a Reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum Novitates* 3343: 1-38.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- Gaines MS, Diffendorfer JE, Tamarin RH, Whittam TS. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88: 294-304.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- IBAMA. 2003. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Available in the World Wide Web at: <http://www.ibama.gov.br/fauna.html> [29/05/2008].
- Isla FI, Gaido ES. 2001. Evolución geológica de la laguna Mar Chiquita. In: Iribarne O, ed. *Reserva de Biosfera Mar Chiquita: características físicas, biológicas y ecológicas*. Mar del Plata: Martín, 19-30.
- IUCN. 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Available in the World Wide Web at: <http://www.iucnredlist.org> [19/04/2013].
- Kacolicis F, Horlent N, Williams J. 2006. Herpetofauna, Coastal Dunes, Buenos Aires Province, Argentina. *Check List* 2: 3.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6196-6200.
- Lema T de. 1994. 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* 7: 41-150.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Mäder M. 2008. Filogeografia e Variabilidade Genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae). Unpublished Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Miller MP. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Moritz C, Faith DP. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.
- Palumbi SR. 1996. Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds. *Molecular systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, 205-247.
- Peters JA, Orejas-Miranda B, Vanzolini PE. 1986. *Catalogue of the Neotropical Squamata (Revised Edition). Part II - Lizards and Amphisbaenians*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Stamatakis S. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Tajima F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor BL, Dizon AE. 1999. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology* 8: S11-S16.

- Tomazelli LJ, Villwock JA. 2000. O Cenozóico no Rio Grande do Sul: geologia da Planície Costeira. In: Holz M, de Ros LF, eds. *Geologia do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: CIGO UFRGS, 375–406.
- Tomazelli LJ, Villwock JA. 2005. Mapeamento geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do RS. *GRAVEL* 3: 109-115.
- Vega LE, Bellagamba PJ, Fitzgerald LA. 2000. Long-term effects of anthropogenic habitat disturbance on a lizard assemblage inhabiting coastal dunes in Argentina. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1653-1660.
- Verrastro L. 1991. Aspectos ecológicos e biológicos de uma população de *Liolaemus occipitalis* Boul. 1885, nas dunas costeiras da praia Jardim Atlântico, Tramandaí, RS. (Reptilia - Iguanidae). Unpublished Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Verrastro L, Bujes C. 1998. Ritmo de atividade de *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Sauria, Tropicuridae) na praia de Quintão, RS - Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 15: 907-914.
- Verrastro L, Krause L. 1999. Ciclo reprodutor de machos em *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885. (Sauria-Tropicuridae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 227-231.
- Verrastro L, Schossler M, Silva CM. 2006. *Liolaemus occipitalis*. *Herpetological Review* 37: 495.
- Villwock JA, Tomazelli LJ. 1995. Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1–45.

Tables

Table 1 - Number of individuals and tissue vouchers of *Liolaemus occipitalis* by locality. Numbers under the *N* column give the number of lizards collected and sequenced from each locality.

Department/State (Country)	Locality	Voucher (UFRGST)	N	Coordinates
Santa Catarina (Brazil)	(PI) Ingleses Beach	460-461, 463-465, 467-469	8	27°26'47"S 48°22'24"W
	(PJ) Joaquina Beach	267-274	8	27°36'33"S 48°27'20"W
	(PC) Campeche Beach	476	1	27°41'35"S 48°29'05"W
	(GA) Garopaba	456-459, 2547-2548	6	28°06'12"S 48°38'36"W
	(FSM) Farol de Santa Marta	262-266	5	28°36'11"S 48°49'03"W
	(MC) Morro dos Conventos	253-254, 256, 258-260	6	28°56'48"S 49°22'13"W
Rio Grande do Sul (Brazil)	(TO) Torres	245-249, 251-252	7	29°22'45"S 49°45'32"W
	(CC) Capão da Canoa	1542-1544	3	29°42'04"S 49°58'51"W
	(CI) Cidreira	309-310, 448-451, 454-455	8	30°06'11"S 50°10'38"W
	(PS) Palmares do Sul	2212	1	30°33'20"S 50°24'21"W
	(MO) Mostardas	292-300, 306	10	31°08'06"S 50°49'50"W
	(SJN) São José do Norte	233-238, 240, 242-244	10	32°07'13"S 52°03'29"W
	(RG) Rio Grande	239, 276-282	8	32°11'57"S 52°10'13"W
	(TA) Taim	209-218	10	32°36'47"S 52°25'12"W
	(SVP) Santa Vitória do Palmar	284-288	5	33°36'33"S 53°12'14"W
	(BC) Barra do Chuí	289-290	2	33°44'22"S 53°21'59"W
Rocha (Uruguay)	(BCY) Barra del Chuy	907-909	3	33°45'26"S 53°23'15"W
	(VA) Valizas	906, 3055	2	34°20'01"S 53°47'28"W

Table 2 – Measures of genetic variability of the *Liolaemus occipitalis* sampled populations. n: number of analyzed sequences; H(freq): haplotype (absolute frequency); S: number of polymorphic sites; Hd: haplotype diversity; π : nucleotide diversity. Locality abbreviations match those in Table 1. Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analysis.

Department/State (Country)	Locality	n	H(freq)	S	Hd	π (per seq.)
Santa Catarina (Brazil)	PI	8	H1(8)	0	0	0
	PJ	8	H2(6) H3(2)	3	0.429 +/- 0.169	1.286 +/- 0.897
	PC	1	H4(1)	-	-	-
	GA	6	H5(6)	0	0	0
	FSM	5	H6(1) H7(3) H8(1)	4	0.700 +/- 0.218	1.600 +/- 1.128
	MC	6	H9(5) H10(1)	2	0.333 +/- 0.215	0.667 +/- 0.587
Rio Grande do Sul (Brazil)	TO	7	H11(5) H12(1) H13(1)	12	0.524 +/- 0.209	5.143 +/- 2.834
	CC	3	H14(2) H15(1)	-	-	-
	CI	8	H16(3) H17(2) H18(1) H19(1) H20(1)	5	0.857 +/- 0.108	1.536 +/- 1.024
	PS	1	H16(1)	-	-	-
	MO	10	H21(1) H22(2) H23(2) H24(1) H25(1) H26(1) H27(1) H28(1)	18	0.956 +/- 0.059	3.867 +/- 2.120
	SJN	10	H23(6) H29(2) H30(1) H31(1)	10	0.644 +/- 0.152	2.156 +/- 1.304
	RG	8	H32(3) H33(3) H34(1) H35(1)	18	0.786 +/- 0.113	7.893 +/- 4.110
	TA	10	H36(7) H37(1) H38(1) H39(1)	17	0.533 +/- 0.180	3.400 +/- 1.899
	SVP	5	H36(1) H40(4)	1	0.400 +/- 0.237	0.400 +/- 0.435
	BC	2	H41(2)	-	-	-
Rocha (Uruguay)	BCY	3	H42(3)	-	-	-
	VA	2	H36(2)	-	-	-

Table 3 - Pairwise comparisons of Φ_{ST} between loci of *Liolaemus occipitalis* based on concatenated haplotypes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) and Cytochrome b (Cytb). Locality abbreviations match those in Table 1. Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analysis.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1-PI	-											
2-PJ	0.86**	-										
3-GA	1.00**	0.95**	-									
4-FSM	0.96**	0.91**	0.93**	-								
5-MC	0.98**	0.93**	0.97*	0.65**	-							
6-TO	0.86**	0.83**	0.72**	0.68**	0.76**	-						
7-CI	0.94**	0.91**	0.74**	0.82**	0.88**	0.63**	-					
8-MO	0.88**	0.85**	0.79**	0.73**	0.80**	0.09	0.73**	-				
9-SJN	0.93**	0.90**	0.88**	0.82**	0.87**	0.14	0.81**	-0.02	-			
10-RG	0.78**	0.75**	0.61**	0.58**	0.66**	0.07	0.54*	0.09	0.13	-		
11-TA	0.88**	0.85**	0.66**	0.75**	0.82**	0.59**	0.39**	0.68**	0.75**	0.50*	-	
12-SVP	0.99**	0.94**	0.97**	0.91*	0.96**	0.72**	0.68**	0.79**	0.87**	0.59**	0.15*	-

* P < 0.05; ** P < 0.001

Table 4 - Analysis of Molecular Variance (AMOVA) among *Liolaemus occipitalis* mtDNA haplotypes from the concatenated genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) and Cytochrome b (Cytb) performed for each of two hierarchical geographic levels: (1) Seven groups: considering all populations subdivided based on into seven group permanent geographical discontinuities in the distribution range; (2) Four groups: all populations based on SAMOVA and BAPS results. AG: among groups; AP/ WG: among populations/ within groups; WP: within populations. Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analyses.

Hierarchical level	Percentage of variability (Fixation Index)	
	Seven groups	Four groups
AG (Φ_{CT})	40.65 (0.41)*	68.03 (0.68)**
AP/ WG (Φ_{SC})	37.11 (0.63)**	12.11 (0.38)**
WP (Φ_{ST})	22.24 (0.78)**	19.86 (0.80)**

* P < 0.05; ** P < 0.001

Table 5 – Correlation coefficient (r) between genetic and geographical distances of the *Liolaemus occipitalis* sampled populations. RS+Uy – populations from Rio Grande do Sul and Uruguay; SC – populations from Santa Catarina.

Species		r
<i>L. occipitalis</i>	All populations	0.348**
	RS+Uy	0.159**
	SC	0.820**

*P < 0.05; ** P < 0.001

Table 6 – Neutrality Tests Tajima's *D* and Fu's *F_s*. SC – populations from Santa Catarina; RS – populations from Rio Grande do Sul; Group 1 – haplotype group formed by H23 and its derivatives; Group 2 – haplotype group formed by H16, H36 and its derivatives; Groups I-IV – groups resulting from the programs SAMOVA and BAPS (Group I: Ingleses Beach, Joaquina Beach; Group II: Farol de Santa Marta, Morro dos Conventos; Group III: Torres, Mostardas, São José do Norte, Rio Grande; Group IV: Garopaba, Cidreira, Taim, Santa Vitória do Palmar). Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analysis.

	<i>D</i>	<i>F_s</i>
All populations	-0.457	-7.163
SC	1.154	4.650
RS	-0.401	-9.474*
Group 1	-1.720*	-6.437**
Group 2	-1.316	-10.280**
Group I	1.280	1.687
Group II	-0.832	-0.194
Group III	-1.257	-5.659*
Group IV	-1.328	-2.643

* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$

Figures

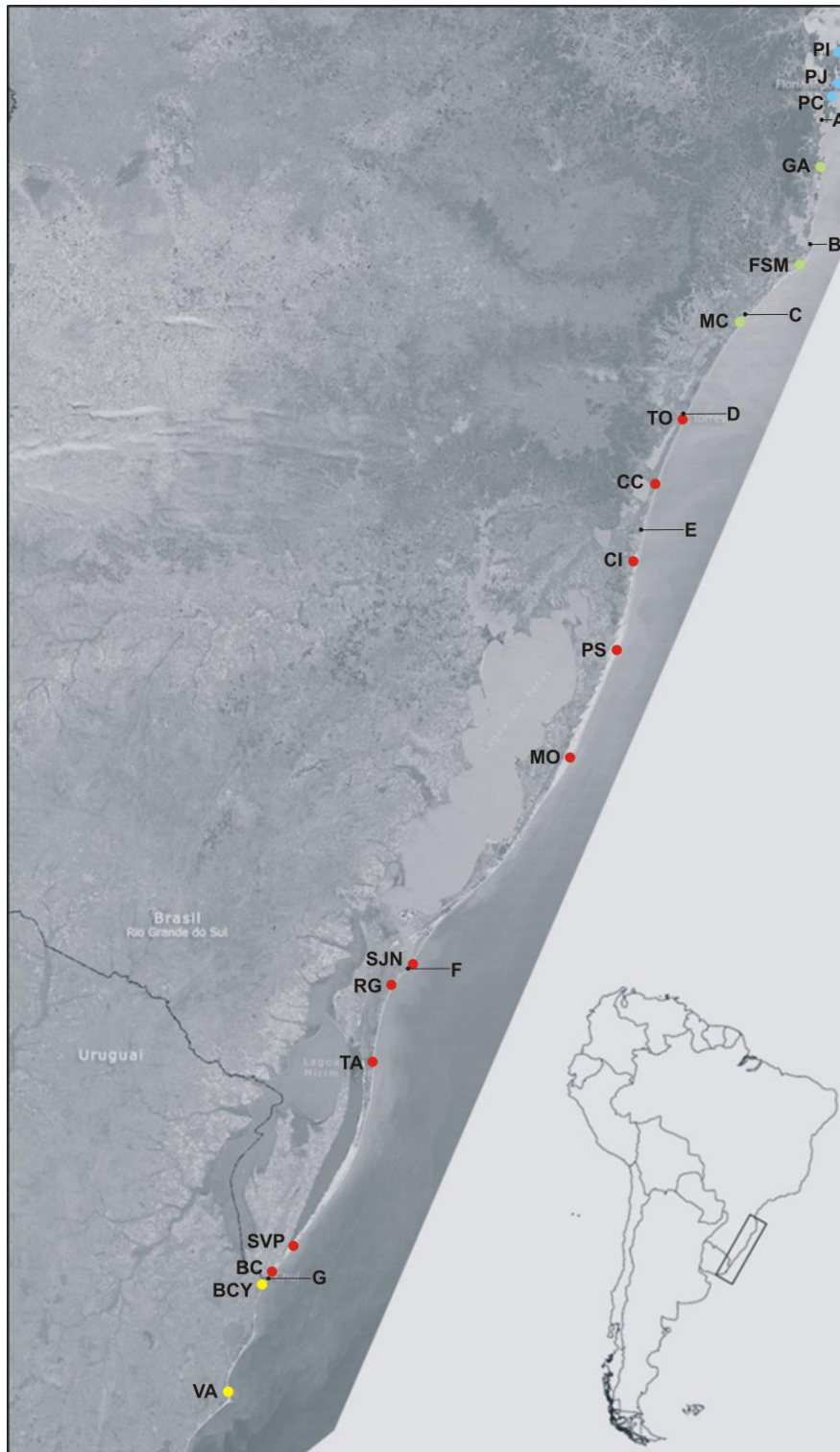


Figure 1 - Sampling localities of *Liolaemus occipitalis*. Locality: PI, Ingleses Beach, PJ, Joaquina Beach, PC, Campeche Beach, GA, Garopaba, FSM, Farol de Santa Marta, MC, Morro dos Conventos, TO, Torres, CC, Capão da Canoa, CI, Cidreira, PS, Palmares do Sul, MO, Mostardas, SJN, São José do Norte, RG, Rio Grande, TA, Taim, SVP, Santa Vitória do Palmar, BC, Barra do Chuí, BCY, Barra del Chuy, VA, Valizas. Barriers: A - Atlantic Ocean, B - Bar of Laguna, C - Araranguá River, D - Mampituba River, E - Tramandaí River, F - Bar of Rio Grande, G - Chuí Creek.

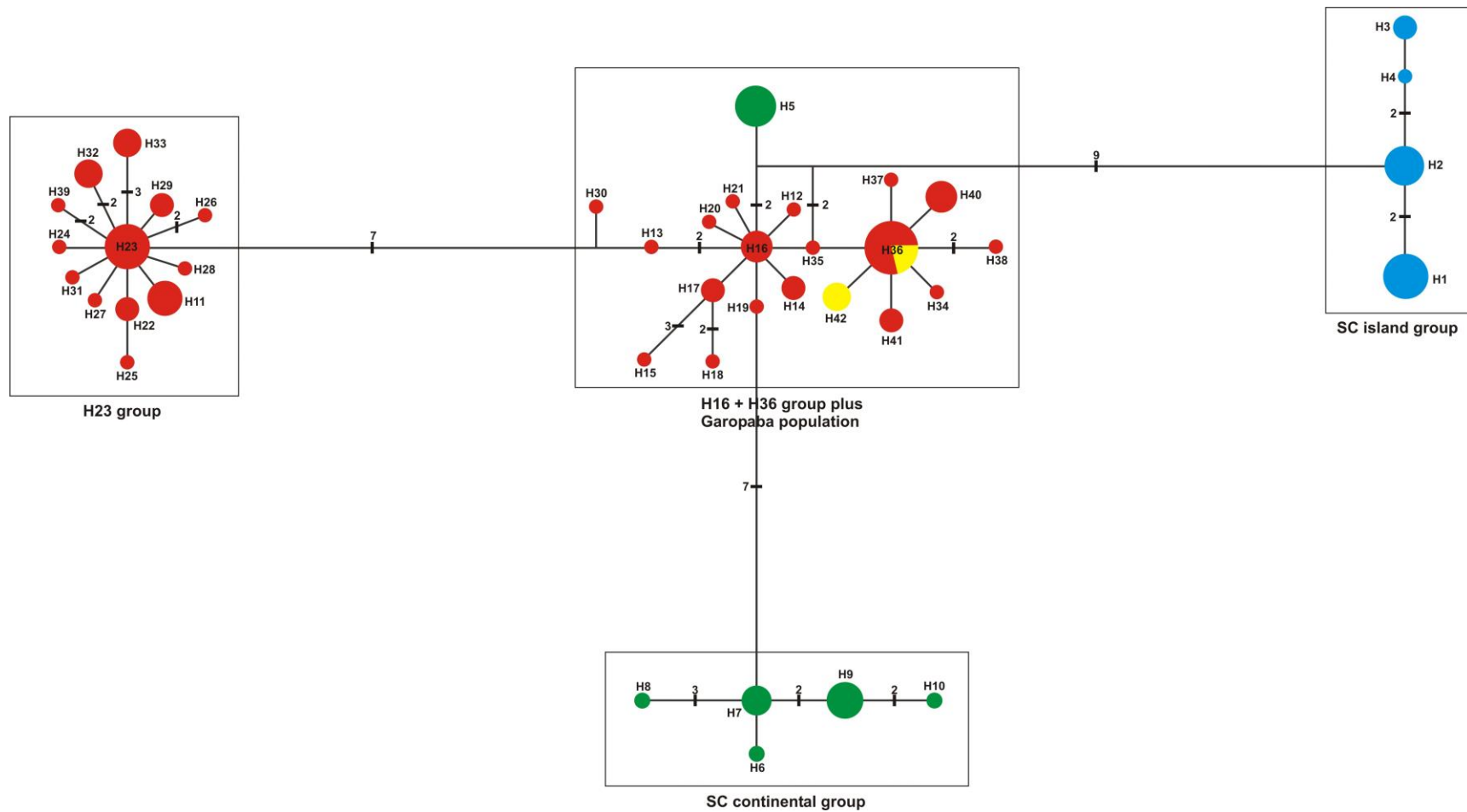


Figure 2 - Haplotype relationships obtained for *Liolaemus occipitalis* (n = 103), according to the *Median-Joining* algorithm. A single mutation between haplotypes (H) is not indicated; more than one mutation is indicated by a black rectangle together with the number of existing mutations. Blue circles – SC island populations; green circles – SC continental populations; red circles – RS populations; yellow circles – Uruguayan populations.

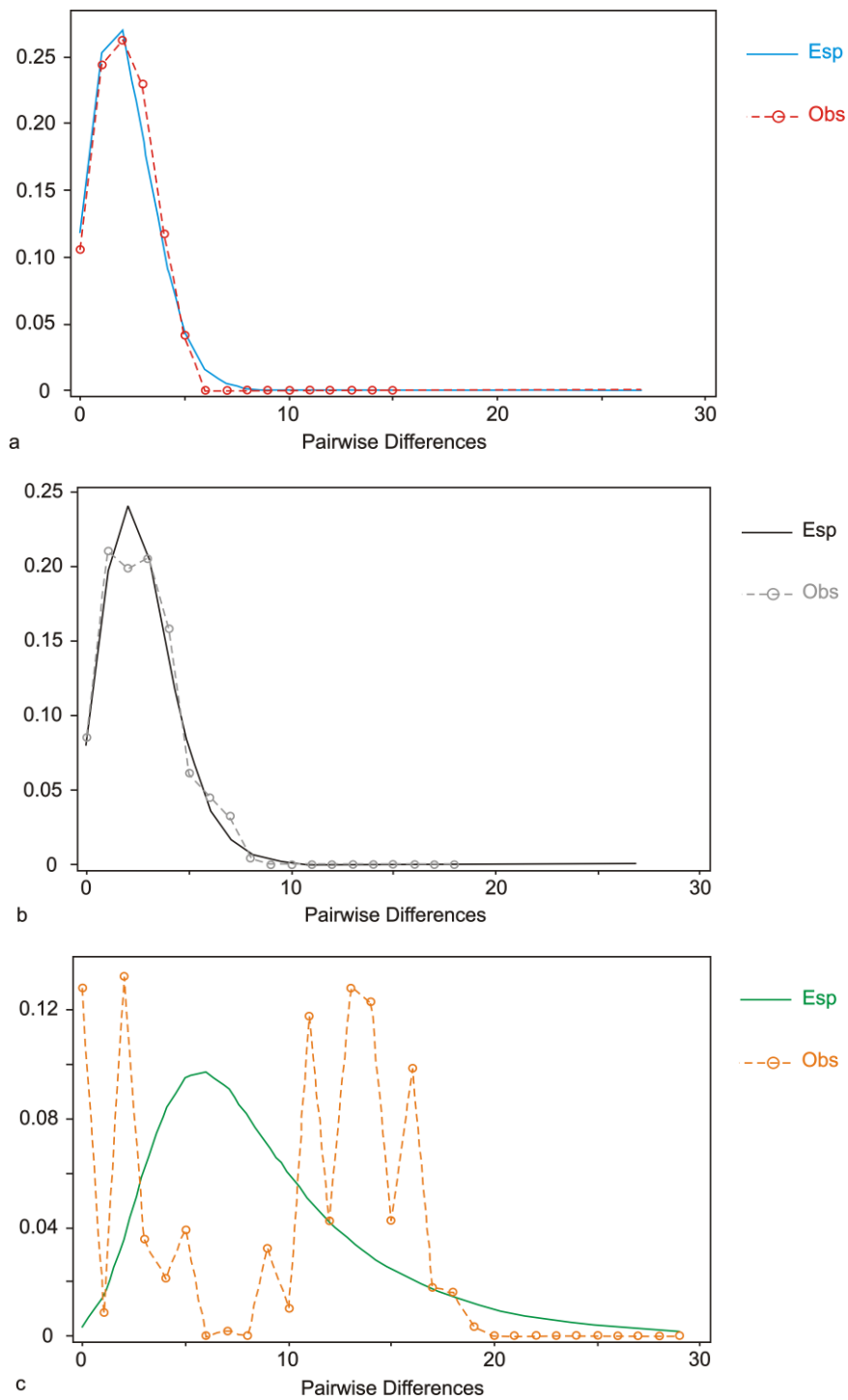


Figure 3 - Mismatch distribution graphs of the concatenated mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 and Cytochrome b of *Liolaemus occipitalis*. (a) Haplotype group H23 and derived haplotypes (b) Haplotype group H16-H36 and derived haplotypes (c) Haplotype group of SC populations. Esp, expected; Obs, observed.

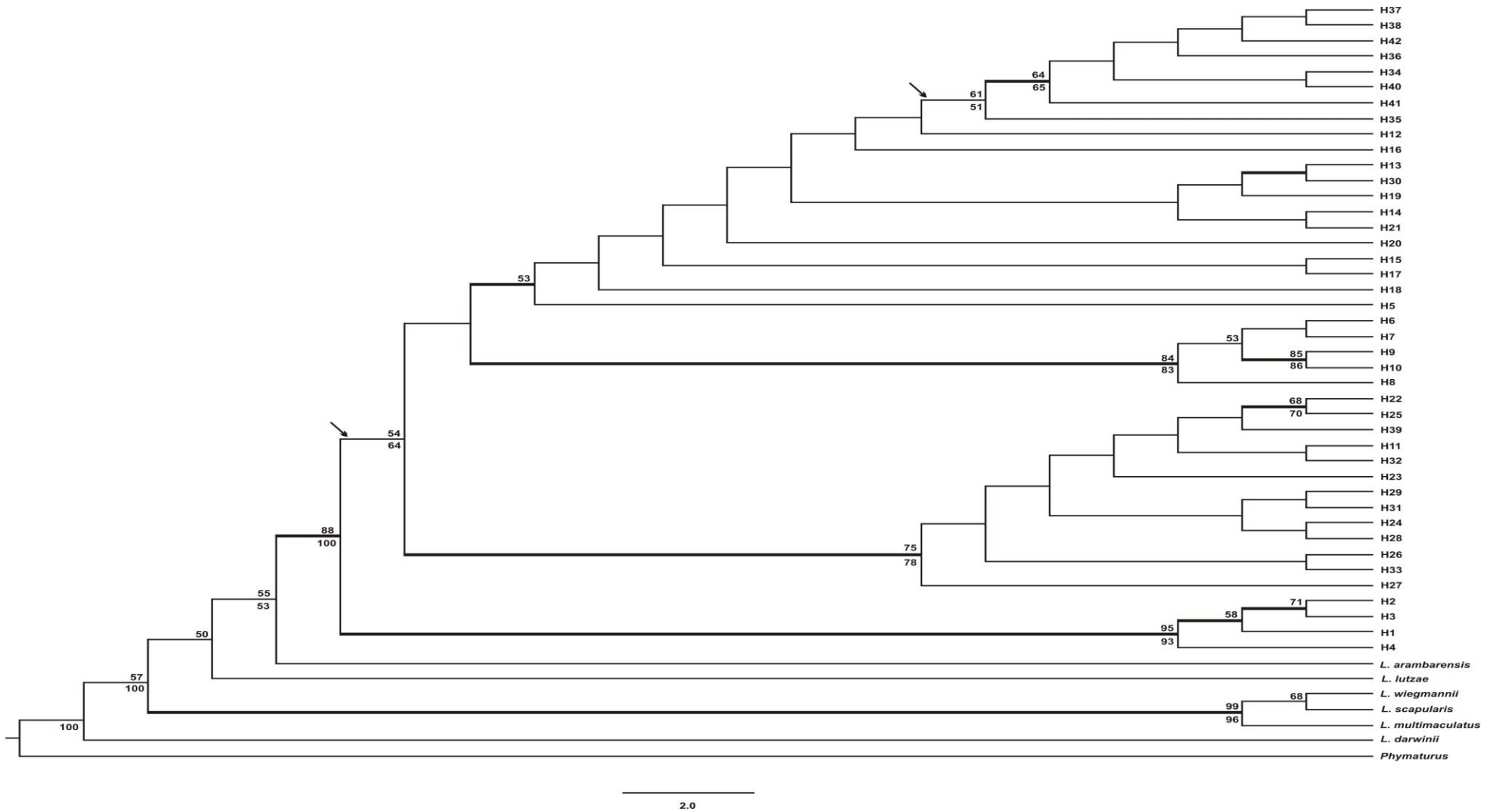


Figure 4 - Maximum Likelihood tree (ML) of haplotypes (H1-H42) of the concatenated mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 and Cytochrome b of *Liolaemus occipitalis*. Numbers above and below branches represent bootstrap values (> 50%) of ML and Maximum Parsimony (MP), respectively. Thicker branches have posterior probability values (PP) between 0.9 and 1.0, and branches indicated by an arrow have PP between 0.8 and 0.9.

III.2. Capítulo II

COMPARATIVE PHYLOGEOGRAPHY OF THREE SPECIES OF THE *LIOLAEMUS WIEGMANNII* SUBGROUP (IGUANIA: LIOLAEMIDAE): EVOLUTIONARY HISTORY OF *L. ARAMBARENSIS*, *L. OCCIPITALIS* AND *L. WIEGMANNII* IN THE SOUTHERN BRAZILIAN AND URUGUAYAN SHORE.

*Caroline M. da Silva¹; Gabriela P. Fernández², Nelson J.R. Fagundes³ & Laura Verrastro¹

¹ Laboratório de Herpetologia, Depto. de Zoologia, Instituto de Biociências, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43.435, CEP: 91.501-970, Bairro Agronomia, Porto Alegre/RS – Brasil. Telefones: (51) 3308-7716/3308-7717; Fax: (51) 3308-7696. E-mail: carol_poabr@yahoo.com.br; lauraver@ufrgs.br

² Laboratorio de Genética y Evolución. Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). Pergamino, Buenos Aires, Argentina. E-mail: gabriela.fernandez@nexo.unnoba.edu.ar

³ Depto. de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS. Av Bento Gonçalves, 9500, Bloco III, Prédio 43312, sala 113, CEP: 91.501-970, Bairro Agronomia, Porto Alegre/RS – Brasil. Caixa-postal: 15053. Telefone: (51) 3308-9826. E-mail: nrosa1977@gmail.com

* Corresponding author

Artigo a ser submetido ao periódico *Zoological Journal of the Linnean Society*

ABSTRACT

The South American temperate herpetofauna is dominated, in terms of species richness, by lizards from the Liolaemidae family (*Liolaemus*, *Phymaturus* and *Ctenoblepharys*). *Liolaemus* is distributed from the Central Peruvian Coast to the South, including Bolivia, Paraguay, Chile, and Argentina, reaching the Atlantic Coast of Uruguay and Southern/Southeastern Brazil. In this study we used concatenated sequences (1402 base pair) of the mitochondrial genes COI and Cyt b to investigate the phylogeographical pattern of *L. arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmannii*. In common, these species occur in the Atlantic Coast of Southern South America, a recent geologic unit whose formation was mostly influenced by a series of sea-level changes (Pleistocene and Holocene) which might have influenced the evolutionary history of these species. Our results show that all species showed some internal phylogenetic structure. Our estimates for the TMRCA of species, intraspecific clades, and species divergence fall in the Pleistocene. There is no evidence of a recent population expansion in *L. arambarensis*, but a synchronic signal of population expansion to *L. occipitalis* and *L. wiegmannii* (around ~40 kya).

Keywords: mtDNA, phylogeography, population expansion, TMRCA

INTRODUCTION

In terms of species richness, South American temperate herpetofauna is dominated by lizards from the Liolaemidae family (Frost *et al.*, 2001), including genera *Liolaemus* WIEGMANN, 1834 (~231 spp. (Breitman *et al.*, 2011)), *Phymaturus* GRAVENHORST, 1837 (~28 spp.), and *Ctenoblepharys* TSCHUDI, 1845 (1 sp.). *Liolaemus* is distributed from the Central Peruvian Coast to the South, including Bolivia, Paraguay, Chile, and Argentina, reaching the Atlantic Coast of Uruguay and Southern/Southeastern Brazil (Etheridge & Espinoza 2000). It is the species richest genera among squamates in Southern South America, with more than 50 new species being described over the last 15 years, especially in Argentina and Chile.

Liolaemus arambarensis VERRASTRO *et al.*, 2003, *L. occipitalis* BOULENGER, 1885, and *L. wiegmannii* (DUMÉRIL & BIBRÓN, 1837) belong to the group “*wiegmannii*” together with eight other species (*L. azarai* AVILA, 2003; *L. cuyumhue* AVILA *et al.*, 2009; *L. lutzae* MERTENS, 1938; *L. multimaculatus* (DUMÉRIL & BIBRÓN, 1837); *L. rabinoi* (CEI, 1974); *L. riojanus* CEI, 1979; *L. salinicola* LAURENT, 1986; and *L. scapularis* LAURENT, 1982) (Etheridge, 1995, 2000; Verrastro *et al.*, 2003; Avila, Perez & Morando, 2003; Avila *et al.*, 2009). In common, these species occur in the Atlantic Coast of Southern South America (even though *L. wiegmannii* has a more widespread distribution in Argentina), a recent geologic unit whose formation might have influenced the evolutionary history of these species.

Liolaemus arambarensis is endemic to restingas (sandbanks) of the Patos Lagoon in the state of Rio Grande do Sul (RS) in Southern Brazil, and is considered Endangered (IUCN, 2012). *Liolaemus occipitalis* inhabits sand dunes in the Atlantic coast of RS and Santa Catarina (SC) states in Southern Brazil (Peters, Orejas-Miranda & Vanzolini, 1986; Lema, 1994; Verrastro, 1991; Verrastro & Bujes, 1998; Verrastro & Krause, 1999). It also occurs in Uruguay, where it occurs along the Atlantic coast up to the left margin of the Valizas stream (Verrastro, Schossler & Silva, 2006). In Brazil, this species is considered Vulnerable (Fontana, Bencke & Reis, 2003; IBAMA, 2003; IUCN, 2012; Resolução

CONSEMA Nº. 002 de 06 de dezembro de 2011). Finally, *L. wiegmanni* occupies a wide range of habitats, reflecting its widespread distribution (Etheridge, 2000), which includes the Argentinean provinces of Entre Ríos, Buenos Aires, Bahía Blanca, La Pampa, San Luís, Mendoza, Tucumán e Jujuy (Ceji, 1979, 1986; Laurent & Teran, 1981; Cabrera & Bee de Speroni, 1986), and Uruguay along the La Plata River and Atlantic coast until the Valizas stream. There are old records of this species in Brazil, but this confusion was solved with the description of *L. arambarensis* in RS (VERRASTRO *et al.*, 2003).

The recent geologic history of the area of occurrence of these species along South America Atlantic coast was mostly influenced by a series of sea-level changes in the Pleistocene and Holocene which led to the deposition of marine sediments in different epochs and to the formation of a series of coastal lagoons which can act as barriers to gene flow in coastal species (Dillenburg & Hesp, 2009). The largest geomorphological domain in this region is the Coastal Plain of the RS state (CPRS), which spans from the Laguna bar, in SC state, to the Polonio Cape in Uruguay, and which has been formed in four major cycles of sea-level changes since the Middle Pleistocene (~400 thousand years ago, kya) (Villwock & Tomazelli, 1995; Tomazelli & Villwock, 2005). Likewise, the region around the La Plata River was formed by sediment deposition since the Pleistocene following the sea-level changes which affected the whole Atlantic coast system (Aguilar, Mesa & Alvez, 2010).

Comparative phylogeography asks whether the historical genetic structure of different species may be caused by common processes. Because geological and climatic events may affect the evolutionary history of several species (Bermingham & Moritz, 1998), and because *L. arambarensis*, *L. occipitalis*, and *L. wiegmanni* have a similar biology relative to their general ecology and dispersal abilities, they represent an interesting system to investigate the effect of sea-level changes in the Quaternary in a group of related taxa. More specifically, we ask: Is there evidence of phylogenetic structure in these taxa? Is there evidence of genetic structure among populations and how does it associate to natural barriers to gene flow in this region? Is there evidence of population growth or decline over time? How do phylogenetic and demographic

inferences associate with the known geological history of this region? Are there common evolutionary patterns among species?

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Overall, we sampled 184 individuals of the three species, representing 27 different localities distributed along the coastal plain of southern Brazil and Uruguay, and four different localities from the interior of Argentina (Figure 1, Table 1). Each sampling locality was considered as a population. All specimens used in this study are deposited in the scientific collections of the Herpetology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGST – tissue collection), Porto Alegre, Brazil; the Herpetological Collection L. J. Avila / M. Morando (LJAMM-CNP) from the National Patagonian center, Puerto Madryn, Argentina (CENPAT-CONICET); the Herpetological Collection of the La Plata Museum, National University of La Plata (MLP.S), La Plata, Argentina; and the herpetological Collection of the Monte L. Bean Life Science Museum, Brigham Young University (BYU), Utah, USA.

Molecular Methods

Genomic DNA was extracted from muscle and/or liver tissue using salting-out precipitation following Medrano, Aasen & Sharrow (1990). Two separate fragments of ~430 bp and ~730 bp of the mitochondrial Cytochrome b were amplified separately using the primers GLUDGL (5'-TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG-3'; Palumbi, 1996), cyt-b 1 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'; Kocher *et al.*, 1989), Primer 3 (5'-GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC-3'; Palumbi, 1996) and Primer 2 (5'-CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA-3'; Palumbi, 1996). PCR reactions used 1 μ L of total DNA, 1X Buffer, 4.0mM MgCl₂, 0.4 μ M dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen), and 33 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec, following a initial denaturing step of 94°C for 1 minute and a final extension step of 72°C for 5 min. We also amplified a fragment of ~617 bp of the mitochondrial Cytochrome C

Oxidase Subunit 1 (COI) using primers COI-L1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') and COI-H2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') using 1 μ L of diluted total DNA (1:10), 1X Buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2 μ M dNTP, 0.2 μ M of each primer and 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Reactions were performed in 34 cycles of 94°C for 30 sec, 47°C for 1 min 30 sec, and 72°C for 1 min, following a initial denaturing step of 94°C for 1 minute and a final extension step of 72°C for 5 min. PCR products were purified using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Invitrogen) following the guidelines of the supplier and sequenced in an ABI Prism 3100 (Applied Biosystem) automated sequencer at Macrogen Inc. (South Korea).

Data Analysis: Molecular Phylogeny and Dating

All chromatograms were checked by eye and all sequences with ambiguous or low quality sequences were re-sequenced after a new PCR amplification. DNA sequences from the two mtDNA genes were aligned using the Muscle algorithm (Edgar, 2004) implemented in the program MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). For each individual the two mitochondrial genes were concatenated, originating an mtDNA haplotype of 1402 bp. We then used the DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) to identify all different haplotypes and to organize a haplotype list which were used in all subsequent analysis.

We used two different approaches to reconstruct the evolutionary history of the observed haplotypes. In the first approach we used a method based on Bayesian Inference (BI) implemented in the program BEAST 1.7.3 (Drummond & Rambaut, 2007). Individuals having identical haplotypes were removed from the analysis. We used a Yule tree-prior, and different nucleotide evolutionary model partitions for the two genes. We further allowed for different partitions for each codon position, as this strategy was better supported by Bayes Factor analysis (data not shown). For the COI gene, the HKY+G model was used, while for the Cytb gene the TN93+G model was used. A list based on the Bayesian Information Criterion (BIC) (Schwarz, 1978) of several evolutionary models generated by MEGA was used to guide the choice of the nucleotide model used in the analysis. The time to the most recent common ancestor

of these lineages (TMRCA) was estimated based on a strict-clock model, assuming a mean rate normally distributed with mean of 2.23×10^{-8} /site/year and standard deviation of 0.5×10^{-8} /site/year (Fontanella *et al.*, 2012). The MCMC was run for 25 million steps sampling every 1,000 step. In this paper we consider PP values greater than 0.9 as strong, and below this, moderate or weak. The final tree was visualized and edited using the program FigTree 1.3.1 (Rambaut, 2009). The second approach used a haplotype network generated in the program Network 4.5.1.6 using the *median-joining* algorithm (Bandelt, Forster & Röhl, 1999). The haplotype network allows the representation of direct ancestral-descendent links, and may represent more accurately intraspecific data (Posada & Crandall, 2001).

Data Analysis: Molecular Diversity, Population Structure and Demographic History

To quantify the level of genetic diversity present in each population and its evolution in both space and time we also estimate several population genetics statistics such as number of haplotypes (H), number of segregating sites (S), haplotype (Hd) and nucleotide diversity (π), as well as the pairwise genetic differentiation between populations (Φ_{ST}) in the program ARLEQUIN 3.0 (Excoffier, Laval & Schneider, 2005). This program was also used to compute the molecular analysis of variance (AMOVA) to estimate the genetic diversity partition among and within populations of all the three species. Populations having less than five individuals were excluded from these analyses due to the small sample size. For all of them, we tested genetic structure considering two hierarchical levels (among/within populations). For *L. occipitalis*, which has been sampled over all its distribution, we also considered seven groups of populations separated by all natural barriers along the species distribution: [A] Atlantic Ocean, [B], bar of Laguna, [C] Araranguá River, [D] Mampituba River, [E] Tramandaí River, and [F] bar of Rio Grande (Figure 1), and then compared the values obtained under this scheme with another one based on groups of populations identified by other molecular spatial methods like Spatial Analysis of Molecular Variance - SAMOVA (Dupanloup, Schneider & Excoffier, 2002) and the Bayesian Analysis of Population Structure - BAPS

(Corander, Sirén & Arjas, 2008). For *L. wiegmanni*, we also considered two or three groups of populations based, respectively, on considering the La Plata River [I] as a natural barrier separating Uruguayan and Argentinean populations (Figure 1), and on the results obtained from SAMOVA and BAPS. To see if there was isolation by distance in our data we used the Mantel test (Mantel, 1967) implemented in the program Alleles in Space 1.0 (Miller, 2005) to check for a positive correlation between genetic and geographic distances using 1000 replications.

Finally, to see if there was evidence of historical changes in population size we used the neutrality tests of Fu's F_s (Fu, 1997) and Tajima's D (Tajima, 1989) implemented in ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Again, populations with less than five individuals were excluded from the analysis. Because neutrality tests can have low power to identify changes in population size we also estimated a Bayesian Skyline Plot (BSP) (Drummond *et al.*, 2005) in the program BEAST for each of three species separately. This analysis used the same clock and nucleotide models described for the phylogenetic analysis, but we included all individuals and the proper coalescent tree-prior allowing for population size changes along the tree. The MCMC was run for 50 million steps sampling every 1000 steps.

RESULTS

Molecular Phylogeny and Dating

We identified 80 different mtDNA haplotypes (GenBank accession numbers XXXXXXXXXXX) based on the 1402 bp alignment resulting from the concatenation of partial sequences for the mtDNA genes COI and Cytb. Of these, ten different haplotypes were found in *L. arambarensis* (H1La – H10La); 51 in *L. occipitalis* (H1Lo – H51Lo) and 19 in *L. wiegmanni* (H1Lw – H19Lw) (Table 2). There was only one haplotype sharing among species (*L. occipitalis* and *L. wiegmanni*).

The Bayesian tree (Figure 3) shows that all species showed some internal phylogenetic structure and that there was maximum support for a sister-relationship between *L. occipitalis* and *L. arambarensis* (PP=1.0). For *L. arambarensis* the Bayesian

tree recovered two mitochondrial lineages, one formed by two haplotypes from Barra do Ribeiro population (H5La, H9La) (PP=0.90), and the other one with the rest of the haplotypes (PP=0.97). Interestingly, a single population (Barra do Ribeiro) harbors all lineages, while all other populations had only one or two closely related mtDNA haplotypes (Table 2). For *L. occipitalis*, the Bayesian tree recovered four well defined clades with maximum support (PP=1.0), but the sister relationships among them cannot be inferred with confidence given the low posterior probability values. Two out of the four clades have haplotypes exclusive from the Santa Catarina state (SC), being one (Clade Locci1) restricted to populations isolated in the Santa Catarina Island (Ingleses Beach, Joaquina Beach, Campeche Beach), and the other one (Clade Locci2) restricted and exclusive from populations found between the Lagoon bar and the Mampituba River (Farol de Santa Marta, Morro dos Conventos). A third clade (Clade Locci3) was dispersed along the Rio Grande do Sul state (RS), but reached a higher frequency in the central part of the species distribution. Finally, a fourth clade (Clade Locci4) was the most widespread, going from Uruguay, in the southern limit of the species distribution, to Garopaba, northern to the Lagoon bar. Interestingly, all populations having haplotypes from Clade Locci3 also had haplotypes from Clade Locci4. The mtDNA lineages found in *L. wiegmanni* are scattered in two well supported clades (Clades Lwieg1 and Lwieg2) separating Argentinean (PP = 1.0) and Uruguayan populations (PP = 1.0), respectively. Curiously, one individual recognized as *L. occipitalis* based on morphology (UFRGST 902) collected in the Uruguayan population of Castillos (Forte de Santa Teresa) had a mtDNA haplotype identical to some individuals from *L. wiegmanni* collected further south (in populations Valizas, Costa Azul, and La Paloma), suggesting that some introgression is occurring in Uruguay, close to the southern edge of *L. occipitalis* distribution and the northern edge of *L. wiegmanni* distribution, even though other sampling localities closer to the distribution limits did not show individuals with mixed morphology x mtDNA lineage. Because this is the only individual collected in this population, and because it does not represent the history of *L. occipitalis* mtDNA

lineages, this sequence was used in phylogenetic analysis, but was removed from population and the skyline plot analysis (see below).

When the evolutionary relationships among haplotypes are shown using a network approach the basic features suggested by the Bayesian tree, such as the major structuring in clades, are strengthened, but other information can be gathered as well. For *L. arambarensis* (Figure 4a), for example, the deep diversity shown by the Barra do Ribeiro population becomes evident. For *L. occipitalis* (Figure 4b), it becomes apparent that the two more widespread clades contain one (H28Lo) or two (H20Lo and H41Lo) central haplotypes in high frequency which give rise to several low frequency haplotypes, in a pattern consistent with population growth (Ferrerri, Qu & Han, 2011). Furthermore, it becomes clear that the haplotype belonging to Clade 4 but occurring in the SC state (H8Lo, Garopaba population) is actually distant from H20Lo by three mutations and is not closely related to any other haplotype from this clade. As noted, most populations from the central part of the species distribution have both Clades 3 and 4: Torres, Mostardas, São José do Norte, Rio Grande, Taim. The “introgressed” status of haplotype H51Lo, shown by one individual sampled in the Castillos population, in Uruguay is also clearly represented as its haplotype falls away from the *L. occipitalis* network by more than 150 mutations. The haplotype network for *L. wiegmannii* (Figure 4c) reinforces the strong divergence between Uruguayan and Argentinean populations, and, within Uruguay further shows that there is some haplotype sharing (H2Lw) among the three populations from the Atlantic coast (Valizas, Costa Azul, La Paloma), but not between them and the population from Colonia, in the mouth of the La Plata river. Interestingly, the H2Lw haplotype, shared among populations along the Atlantic coast in Uruguay, is the one (H51Lo) found in the individual UFRGST 902 collected in the Castillos population – in the Atlantic coast – and identified as *L. occipitalis*.

According to the TMRCAs (Table 3), the split between *L. arambarensis* and *L. occipitalis* fall in the Lower Pleistocene (~2 Mya). Overall, TMRCAs for the three species fall around the Middle Pleistocene, being ~525 kya for *L. wiegmannii*, ~147 kya for *L.*

arambarensis, and ~335 kya for *L. occipitalis*, but the credible intervals are highly overlapped. Interestingly, the values for all clades, irrespective of the species they came from, were very similar, with point estimates varying from ~101 kya (Locci2) to ~154 kya (Locci4).

Data Analysis: Molecular Diversity, Population Structure and Demographic History

Most *L. arambarensis* populations had very low polymorphism, with only one or two mtDNA haplotypes. The exception was the Barra do Ribeiro population, which had six mtDNA haplotypes and a relatively high haplotype diversity ($H_d = 0.92$) (Table 2). On contrary, among the *L. occipitalis* populations for which more than five individuals have been sampled only one (Garopaba) was monotypic at the mtDNA level. The remaining populations had between two and eight different haplotypes, with H_d values above 0.52. Among *L. wiegmannii* populations, there was low diversity among Atlantic populations from Uruguay, where two out of three populations had a single mtDNA haplotype and the only polymorphic population (Costa Azul) had two haplotypes separated by a single mutation. In contrast, Colonia, in the La Plata River, was more diverse, with five different haplotypes. It is complicated to find general patterns for the Argentinean populations as only one of them had a sample size higher than five. Anyway, all populations for which two or more individuals were collected were polymorphic at the mtDNA level (Table 2).

Pairwise Φ_{ST} for *L. arambarensis* populations (Table 4) showed statistically significant values, but, interestingly, comparisons involving Barra do Ribeiro and all other populations resulted in smaller values, while all other comparisons showed high values. Together with the much high diversity found in Barra do Ribeiro, this may suggest that this population is an important "source" population for this species, connecting all populations from a genetic point of view. Concerning *L. occipitalis*, pairwise Φ_{ST} (Table 4) also resulted in many statistically significant values, suggesting strong genetic structure in this species. Non-significant values involved populations where haplotypes from both clades Locci3 and Locci4 were found at intermediate frequencies (Torres,

Mostardas, São José do Norte, Rio Grande). In some cases, clade content, rather than geography can explain the observed Φ_{ST} values. For example, the Taim population, despite having both Locci3 and Locci4 haplotypes, had its lowest pairwise Φ_{ST} when compared with Cidreira, which only has Locci4 haplotypes. Even though these populations are not neighbor, Taim has a higher frequency of haplotypes from the Locci4 clade. It is also noteworthy that the two populations (São José do Norte and Rio Grande) separated by the Rio Grande bar, arguably the strongest natural barrier in this region, did not show a significant Φ_{ST} value, which may indicate that the exit of the Patos Lagoon was unstable for some time in the past, and suggesting that natural barriers do not provide a very good explanation for the genetic structure in *L. occipitalis*. Among *L. wiegmanni* populations, the pairwise Φ_{ST} (Table 4) shows non-significant values for the Atlantic populations in Uruguay (Valizas, Costa Azul, La Paloma), which also showed haplotype sharing (Table 2). On the other hand, these populations were significantly separated from the Uruguayan population in the La Plata River (Colonia) and the only Argentinean population for which this analysis was performed due to sample size (San Luis).

The AMOVA showed a significant genetic structure considering two hierarchical levels for all species (Table 5). For *L. wiegmanni*, the maximum value for the “among populations” component was found using the SAMOVA/BAPS structure which considered three groups of populations: San Luis, in Argentina, Colonia, close to the La Plata River, in Uruguay, and the three Atlantic populations from Uruguay (Valizas + Costa Azul + La Paloma) ($\Phi_{CT} = 0.93$, Table 5). For *L. occipitalis*, the maximum value for the “among populations” component was observed when populations are together in one group ($\Phi_{ST} = 0.77$, Table 5), because the share of haplotypes occurs more at the clade level instead at the population level. When populations are grouped, the maximum Φ_{CT} observed was 0.68 after defining four population clusters based on SAMOVA/BAPS results (Table 5). Population clusters were defined as: Cluster 1: Ingleses Beach + Joaquina Beach; Cluster 2: Farol de Santa Marta + Morro dos Conventos; Cluster 3: Torres + Mostardas + São José do Norte + Rio Grande; Cluster 4: Garopaba +

Cidreira + Taim + Santa Vitória do Palmar. These clusters follow roughly the frequency of each haplotype clade (Cluster 3 contains all populations in which clade Locci3 had high frequency), but have only a loose relationship to the natural barriers occurring in this area (see Material and Methods and Figure 1 for details), as the Φ_{CT} in this case is only of 0.41.

There was a positive and significant correlation between genetic and geographic distances for all species (Table 6), suggesting that isolation by distance plays some role in these species. However, the correlation coefficient shown by *L. arambarensis* and *L. occipitalis* was only moderate ($r=0.364$ and 0.345 , respectively), and it was high for *L. wiegmannii* ($r=0.949$). When *L. wiegmannii* and *L. occipitalis* were analyzed in geographic subgroups, *L. wiegmannii* populations from Uruguay, but not Argentina, maintain a significant relationship between genetic and geographic distance. The strong genetic structure between Argentinean and Uruguayan populations as well as the distinctiveness of Colonia population among the latest might be influencing these results, nonetheless. In agreement with this interpretation, when only populations from the Uruguayan Atlantic Coast are analyzed there is a weak but significant negative correlation between geography and genetic distance. Concerning *L. occipitalis*, populations from the SC state, which have a northern and a southern clade (Locci1, and Locci2, respectively), and an "intermediate" population (Garopaba) with different clade (Locci4) displayed a significant and strong correlation ($r=0.825$), but populations from RS and the Uruguay, where clades Locci3 and Locci4 co-occur in most populations, had only a low though significant correlation ($r=0.157$). The low values found for the RS and Uruguayan populations might indicate a recent spatial expansion, with insufficient time for population differences to accumulate following an isolation by distance process.

Almost all neutrality tests resulted in non-significant values irrespective whether for all populations or subgroups used in the AMOVA analysis (Table 2). However, some RS populations and/or subgroups of *L. occipitalis* did show significant values for Tajima'D (Mostardas, São José do Norte, and Taim) or Fu's F_s (Cidreira, Mostardas, Group III)

(Table 2). The BSP for each species corroborated the result that *L. arambarensis* seems to have maintained a constant population size over the last 100 kya, but suggested a population expansion for *L. occipitalis* starting ~40 kya (Figure 2a). The results for *L. wiegmannii* may be similar to that of *L. occipitalis*, but the credible interval is broad. Based on the results from previous analysis we decided to test if a signature of population expansion would be clearer when different sets of populations were analyzed in separate. For *L. wiegmannii* (Figure 2c), there was no signal of population expansion neither for the Argentinean nor the Uruguayan populations. On the other hand, for *L. occipitalis* there was no signal of population expansion for the SC populations, but a clear signature of population expansion for the populations coming from RS and Uruguay (Figure 2b), starting ~40 kya, suggesting that the population expansion suggested in the first analysis might have involved only a geographic subset of the species' whole distribution.

DISCUSSION

General Patterns

In a recent review about phylogeographic studies in South America, Turchetto-Zolet *et al.* (2012) commented emerging general patterns in this region, putting some emphasis on the contrast between climatic events, which are usually associated with expansion/differentiation events occurred in the Pleistocene, and geological processes occurred in the Pliocene, which are usually associated with older divergence events revealed by genetic data. Overall, the timing of genetic divergence events is roughly bimodal, with the highest peak around 0.1-1.0 million years ago (Mya) (divergences occurred during the Pleistocene account for 57% of all dated events), and a second peak in late Pliocene, around 2.7-4.0 Mya (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012).

Our estimates for the TMRCA of species, intraspecific clades, and species divergence fall in the Pleistocene, even though the credible interval for the divergence between *L. arambarensis* and *L. occipitalis* spans the Pliocene as well (Table 3). Interestingly, the divergence between this two species is much older than the initial

formation of the CPRS by 400 kya (Villwock & Tomazelli, 1995; Tomazelli & Villwock, 2005), suggesting that the lineage leading to *L. occipitalis* is much older than the geomorphological unit where it is mostly found nowadays, which may imply in a more recent colonization of these areas from adjacent regions which have been undisturbed by the initial formation of the CPRS. The TMRCA for all clades have similar values between ~100 kya and ~150 kya, which are also very similar to the TMRCA for *L. arambarensis*, whose geographic distribution is much more restricted than that of the other two species. This may suggest that different species (such as *L. occipitalis* and *L. wiegmanni*) may have maintained a similar effective population size for subpopulations in a geographic structured metapopulation model, while for *L. arambarensis*, its narrow distribution make the whole species effective size to be similar to that found in a genetic subpopulation of the more widely distributed species.

The divergence among clades within *L. occipitalis*, around 335 kya, is close to the initial formation of the CPRS. Even though it is tempting to associate these two events, it must be noted that there are populations of *L. occipitalis* out of the CPRS, and that the TMRCA should not be confused with the origin of the species. However, it is possible that this date indicates the establishment of geographic divergent populations which could be associated with the initial formation and expansion of the CPRS (Tomazelli & Villwock, 2005; Weschenfelder, Corrêa & Aliotta, 2005; Dillenburg & Hesp, 2009). The lack of phylogenetic support for Locci1-4 clades may be taken in support of a rapid divergence (Johnson *et al.*, 2006) associated with a rapid initial expansion of this species in the CPRS. Finally, for *L. wiegmanni*, the divergence of its two subclades, which separate populations in coastal Uruguay from those in Argentina, may be associated with the formation of the La Plata river system (Cavallotto, Violante & Parker, 2004).

Even though it is difficult to make precise associations with the geological history of this area and the time of dated events in the mtDNA phylogeny, it is noteworthy that while we studied a recent environment and found events dating back from the Pleistocene, another study using a widely distributed species in Argentina (*L. bibronii*)

found much older intraspecific divergences (Morando *et al.*, 2007). For example, the most recent divergence within the Northern group of *L. bibronii* was estimated around 1.5-2.3 Mya, while in the Southern group, the most recent divergence was estimated around 0.9-1.4 Mya, much older than the values reported in our study.

Population history

Liolaemus arambarensis has a single population, BRI, with high genetic diversity and containing representatives of all major mtDNA lineages of the species. On the other hand, the remaining populations have only one or two haplotypes which are phylogenetically related to Barra do Ribeiro haplotypes, which may indicate that Barra do Ribeiro could have served as a source population for the foundation of other populations. The much more restricted mtDNA diversity in these populations may indicate either a founder effect or that these populations are incapable of maintain an effective population size as large as Barra do Ribeiro, or both, but more loci are needed to contrast these possibilities. In any case, these results highlight the relevance of the Barra do Ribeiro population of conservation purposes. The lack of haplotype sharing among populations indicates that at least for females these populations do not exchange migrants frequently, and therefore, Φ_{ST} values (Table 4) indicate phylogenetic history rather than recent migration. The BSP analysis suggests that there is no evidence of a recent population expansion (Figure 2a), implying in an old stability of a source-sink dynamics that may be characteristic of this species (Gaggiotti, 1996).

Concerning *L. wiegmannii*, we found a strong genetic structure separating Argentinean and Uruguayan populations, corroborating the idea that the La Plata river is an effective barrier against gene flow in this species. There was also some structure within Uruguay considering Colonia, in the La Plata river coast, and the three populations from the Atlantic coast (Valizas, Costa Azul, La Paloma). The phylogeny supports (PP=1.00) a clade containing the Atlantic Coast, but the analysis was inconclusive in regard to the relationship between haplotypes from these two regions. The maximum clade credibility tree suggests that haplotypes from Colonia are

paraphyletic in relation to those from the Atlantic Coast group, but the support was modest (PP=0.77). Anyway, this could indicate a Southwest/Northeast migration route along an incipient modern Atlantic coast shoreline.

Liolaemus wiegmanni has a broad distribution in Argentina, and our sampling from Argentinean populations in this study was intended to allow a contrast between coastal populations in Uruguay and the coastal species *L. arambarensis* and *L. occipitalis*. The interior San Luis population, in Argentina, had similar diversity levels when compared to the Colonia population, but both were much more diverse than any population from the Atlantic Coast. Similar to the case of *L. arambarensis* where a single population contains much of the diversity, this could either indicate a founder effect during the colonization of the Uruguayan Atlantic coast or that these populations maintain a lower effective size than both Colonia and San Luis populations. Interestingly, the BSP analysis detected a signal of a recent (~40 kya) population expansion for the whole species (considering the populations samples in this study), but our data could not show if this signal was exclusive from the Uruguayan or Argentinean population (Figure 2c). Therefore it is hard to associate this expansion to the formation of the modern Coastal plain or to a more general climatic effect affecting both populations. Studies using other species of this genus have been done for populations in the countryside of Argentina (Morando *et al.*, 2004, 2007, 2008). Overall, they found for geographic clades similar to those estimated here for Colonia and San Luis which corroborate that the diversity in the Atlantic Coast of Uruguay is reduced.

For *L. occipitalis* our data reveals four distinct clades, and even though their phylogenetic relationship cannot be inferred with certainty, two of them are exclusive from the SC state, being one found in insular populations and the other in continental populations, one is restricted to the RS state, and the other one is more widespread, being found from SC to Uruguay. It is noteworthy that the SC population having Locci4 haplotype is not geographically close to RS, and also that this haplotype is also clearly distinct from those found in RS and Uruguay (Figure 4b). Thus, Locci4 does not imply in a recent re-colonization of SC by individuals coming from the RS. Given that the

evolutionary relationships among *L. occipitalis* clades are not resolved, we can use the species' TMRCA (~330 kya) as an upper limit for their divergence. One potential explanation for this curious pattern is that these clades were more widely distributed, with Locci4 becoming extinct from Southern SC, but not in the Garopaba population. If we consider that the upper limit of the TMRCA spans the initial phase of the CPRS formation, environmental instability could have played an important role in an extinction/re-colonization dynamics which affected clade distribution across the species' distribution. An alternative to this complex dynamics would involve a simple ancient long distance dispersal event. However, considering that dispersal capabilities in these animals should be limited, it would be interesting to evaluate the likelihood of the more complex scenario described above with more genetic data.

Similar to *L. wiegmanni*, there is evidence for population expansion in *L. occipitalis* ~40 kya (Figure 2a). In this case, however, the expansion seems to be restricted to populations from RS and the Uruguay, with populations from SC showing evidence of a constant population size (Figure 2b). The constant population size in SC may reflect the fact that most populations from SC occur in more restricted beaches with several natural barriers between adjacent populations, while in RS the environment allows more connectivity between populations and there are more habitats to allow larger population sizes. The similar expansion times for *L. occipitalis* and *L. wiegmanni* (consisting of both Coastal and Interior populations) might indicate that not only the formation of the CPRS was important for determining population size, but also that climatic events affecting all these taxa may have played a role in population expansions, with habitat availability acting as a limiting factor in the case of the SC populations. This model would explain the gap between the establishment of the third depositional cycle (~120 kya) which formed most of the sandbar closing the Patos lagoon (Tomazelli & Villwock, 2005), and the signal of population expansion which occur only by ~40kya.

For a species with limited dispersal abilities (Verrastro, 1991), it was surprising that current natural barriers do not account for a large fraction of genetic variance among

groups of populations (Table 5). The general low dispersal is indicated for *L. occipitalis* by several significant Φ_{ST} values (Table 4). Moreover, in Chile, rivers Maipo, Yeso and Aconcagua were the major dispersal barriers for *L. monticola* (Torres-Pérez *et al.*, 2007), while for *L. lineomaculatus*, river Chico was also identified as a putative ancient barrier to gene flow (Breitman *et al.*, 2011). On the other hand, we observed non-significant Φ_{ST} values for populations located in opposite margins of the Rio Grande bar, which marks the exit of the Patos lagoon and which is arguably the strongest natural barrier in RS. The lack of agreement between natural barriers and genetic structure indexes may indicate that because the CPRS have been formed along the last 400 kya most of this barriers were unstable in space or time. Indeed, there are several documented paleo-channels in the CPRS (Corrêa, Aliotta & Weschenfelder, 2004; Weschenfelder, 2005; Weschenfelder *et al.*, 2008a,b) which seems to have affected the genetic structure of some organisms (Mäder, 2008). Thus, the changing nature of the natural barriers in this region may have created a mosaic pattern of genetic divergences which cannot be easily retrieved from current landscape features. However, for the rodent *Ctenomys flamarioni*, another species occurring in the CPRS, there was a good agreement between current natural barriers and genetic structure (Fernández-Stolz, Stolz & Freitas, 2007). Therefore, the origin of each species in the CPRS and how they respond to each kind of natural barrier and environmental change may affect genetic structure differently, and it might be difficult to get general shares phylogeographic even in recent and relatively homogeneous systems such as the CPRS.

It is important to emphasize that we found a phenotypic *L. occipitalis* individual from Uruguayan Castillos population with an introgressed *L. wiegmanni* mtDNA haplotype from further south populations (Valizas, Costa Azul, La Paloma). This introgression occurs close to the southern edge of *L. occipitalis* distribution and the northern edge of *L. wiegmanni* distribution, even though other sampling localities closer to the distribution limits did not show other individuals with mixed morphology x mtDNA lineage. Introgression between different species of the genus *Liolaemus* have been documented in some studies. Morando *et al.* (2004) presented the first evidence for

introgression in lizards from temperate South America (of *L. darwinii* mitochondrial DNA into *L. laurenti* and *L. grosseorum*), and for incomplete lineage sorting (between *L. darwinii* and *L. laurenti*). Morando *et al.* (2007) found evidence for introgression between *L. bibronii* and *L. gracilis* in the same area that introgression was hypothesized in the *Liolaemus darwinii* complex. Olave *et al.* (2011), extending the work of Morando *et al.* (2007), identified morphological *L. bibronii* individuals with introgressed *L. gracilis* mtDNA haplotypes, and the reciprocal pattern for one *L. gracilis* individual. However, we will not detail this issue because it is not part of the scope of our research, but future studies are necessary to elucidate this question.

MtDNA is a widely used marker for evolutionary studies, but it has limitations such as the fact that it's exclusively uniparental inheritance and in most species may tell a biased history of its dispersal. It is also a single non-recombining locus, and therefore, its coalescence pattern may not reflect the evolutionary history of the studied species (Avice & Wollenberg, 1997; Edwards & Bensch, 2009; Toews & Brelsford, 2012). Despite these limitations, Avila, Morando & Sites Jr (2006) reported that an evolutionary hypothesis based on mtDNA was corroborated by autosomal markers. Thus, mtDNA is still a useful marker for understanding species evolution history, even though including autosomal markers is certainly desired for more complete picture of the evolutionary processes affecting genetic structure.

FUNDING

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) with a PhD scholarship granted to C.M da Silva and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (proc. 479412/2008-1, coordinated by Luiz R. Malabarba).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the colleagues and technical laboratories of Herpetology and Molecular Biology, Department of Zoology, UFRGS, and Cytogenetics Laboratory,

Department of Genetics, UFRGS; the staff of the Postgraduate Program in Animal Biology, UFRGS; and Mariana Morando and Luciano J. Avila (CENPAT-CONICET) by the genetic material donated for this study.

REFERENCES

- Aguilar CG, Mesa V, Alvez MC. 2010. Sinopsis Geológico-Ambiental de la Costa Platense y Atlántica de Uruguay. In: López RA, Marcomini SC, orgs. *Problemática de los Ambientes Costeros: Sur de Brasil, Uruguay y Argentina*. Buenos Aires: Editorial Croquis, 57-74.
- Avila LJ, Perez CHF, Morando M. 2003. A new species of *Liolaemus* (Squamata: Iguania: Liolaemidae) from northwestern Patagonia (Neuquén, Argentina). *Herpetologica* 59: 532–543.
- Avila LJ, Morando M, Sites Jr JW. 2006. Inferring evolutionary processes in “inertial species” – an example in Patagonian lizards of the *Liolaemus fitzingerii* complex (Squamata: Liolaemidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 241–275.
- Avila LJ, Morando M, Perez DR, Sites Jr JW. 2009. A new species of *Liolaemus* from Añelo sand dunes, northern Patagonia, Neuquén, Argentina, and molecular phylogenetic relationships of the *Liolaemus wiegmanni* species group (Squamata, Iguania, Liolaemini). *Zootaxa* 2234: 39–55.
- Avice JC, Wollenberg K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7748–7755.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bermingham P, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-370.
- Breitman MF, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M. 2011. Lizards from the end of the world: phylogenetic relationships of the *Liolaemus lineomaculatus* section (Squamata: Iguania: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 364–376.

- Cabrera M, Bee de Speroni NT. 1986. Composición y distribución de la lacertofauna de la provincia de Córdoba, Argentina. II. Amphisbaenidae, Anguidae e Iguanidae. *Historia Natural* 6: 1-12.
- Cavallotto JL, Violante RA, Parker G. 2004. Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina). *Quaternary International* 114: 155–165.
- Cei JM. 1979. Nota preliminar sobre la distribución geográfica de *Liolaemus wiegmanni* (Duméril et Bibron) (Sauria, Iguanidae). *Publicaciones Ocasionales del Instituto de Biología Animal, Universidad Nacional de Cuyo, Serie Científica* 14: 1-4.
- Cei JM. 1986. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. *Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, Monografie* 4: 1-527.
- Corander J, Sirén J, Arjas E. 2008. Bayesian Spatial Modelling of Genetic Population Structure. *Computational Statistics* 23: 111-129.
- Corrêa ICS, Aliotta S, Weschenfelder J. 2004. Estrutura e Evolução dos Cordões Arenosos Pleistocênicos no Canal de Acesso à Laguna dos Patos-RS, Brasil. *Revista Pesquisas em Geociências* 31: 69-78.
- Dillenburg SR, Hesp PA. 2009. *Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185-1192.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2471-2581.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Edwards SV, Bensch S. 2009. Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Ecology* 18: 2930–2933.

- Etheridge R. 1995. Redescription of *Ctenoblepharys adspersa* Tschudi, 1845, and the taxonomy of Liolaeminae (Reptilia: Squamata: Tropicuridae). *American Museum Novitates* 3142: 1-34.
- Etheridge R. 2000. A review of lizards of the *Liolaemus wiegmannii* group (Squamata, Iguania, Tropicuridae), and a history of morphological change in the sand-dwelling species. *Herpetological Monographs* 14: 293-352.
- Etheridge R, Espinoza RE. 2000. Taxonomy of the Liolaeminae (Squamata: Iguania: Tropicuridae) and a semi-annotated bibliography. *Smithsonian Herpetological Information Service* 126: 1-64.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, Freitas TRO. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88: 935-945.
- Ferreri M, Qu W, Han B. 2011. Phylogenetic networks: A tool to display character conflict and demographic history. *African Journal of Biotechnology* 10: 12799-12803.
- Fontana CS, Bencke GA, Reis RE. 2003. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Fontanella FM, Feltrin N, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M. 2012. Early stages of divergence: phylogeography, climate modeling, and morphological differentiation in the South American lizard *Liolaemus petrophilus* (Squamata: Liolaemidae). *Ecology and Evolution* 2: 792-808.
- Frost DR, Etheridge R, Janies D, Titus TA. 2001. Total Evidence, Sequence Alignment, Evolution of Polychrotid Lizards, and a Reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum Novitates* 3343: 1-38.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- Gaggiotti OE. 1996. Population Genetic Models of Source-Sink Metapopulations. *Theoretical Population Biology* 50: 178-208.
- IBAMA. 2003. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Available in the World Wide Web at: <http://www.ibama.gov.br/fauna.html> [29/05/2008].
- IUCN. 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Available in the World Wide Web at: <http://www.iucnredlist.org> [19/04/2013].
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ. 2006. The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science* 311: 73-77.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6196-6200.
- Laurent RF, Teran E. 1981. *Lista de los anfibios y reptiles de la provincia de Tucumán*. Tucumán: Ministerio de Cultura y Educación, Fundación Miguel Lillo.
- Lema T de. 1994. 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* 7: 41-150.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Mäder M. 2008. Filogeografia e Variabilidade Genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae). Unpublished Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.

- Miller MP. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Morando M, Avila LJ, Baker J, Sites Jr JW. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution* 58: 842–861.
- Morando M, Avila LJ, Turner CR, Sites Jr JW. 2007. 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* 43: 952–973.
- Morando M, Avila LJ, Turner C, Sites Jr JW. 2008. Phylogeography between valleys and mountains: the history of populations of *Liolaemus koslowskyi* (Squamata, Liolaemini). *Zoologica Scripta* 37: 603–618.
- Olave M, Martinez LE, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M. 2011. Evidence of hybridization in the Argentinean lizards *Liolaemus gracilis* and *Liolaemus bibronii* (Iguania: Liolaemini): An integrative approach based on genes and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 381–391.
- Palumbi SR. 1996. Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds. *Molecular systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, 205-247.
- Peters JA, Orejas-Miranda B, Vanzolini PE. 1986. *Catalogue of the Neotropical Squamata (Revised Edition). Part II - Lizards and Amphisbaenians*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Posada D, Crandall KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16: 37-45.
- Rambaut, A. 2009. Tree Figure Drawing Tool. Available in the World Wide Web at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [23/09/2011].
- Schwarz GE. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6: 461–464.
- Tajima F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Toews DPL, Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21: 3907–3930.
- Tomazelli LJ, Villwock JA. 2005. Mapeamento geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do RS. *GRAVEL* 3: 109-115.
- Torres-Pérez F, Lamborot M, Boric-Bargetto D, Hernández CE, Ortiz JC, Palma RE. 2007. 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* 45: 72–81.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C. 2012. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology, Invited Review and Meta-Analyses* 1-21.
- Verrastro L. 1991. Aspectos ecológicos e biológicos de uma população de *Liolaemus occipitalis* Boul. 1885, nas dunas costeiras da praia Jardim Atlântico, Tramandaí, RS. (Reptilia - Iguanidae). Unpublished Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Verrastro L, Bujes C. 1998. Ritmo de atividade de *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Sauria, Tropicuridae) na praia de Quintão, RS - Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 15: 907-914.
- Verrastro L, Krause L. 1999. Ciclo reprodutor de machos em *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885. (Sauria-Tropicuridae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 227-231.
- Verrastro L, Veronese L, Bujes C, Dias Filho MM. 2003. A new species of *Liolaemus* from southern Brazil (Iguania: Tropicuridae). *Herpetologica* 59: 105-118.
- Verrastro L, Schossler M, Silva CM. 2006. *Liolaemus occipitalis*. *Herpetological Review* 37: 495.

- Villwock JA, Tomazelli LJ. 1995. Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1–45.
- Weschenfelder J. 2005. Processos sedimentares e variação do nível do mar na região costeira do Rio Grande do Sul. Unpublished D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS, Aliotta S. 2005. Elementos arquiteturais do substrato da Lagoa dos Patos revelados por sísmica de alta resolução. *Pesquisas em Geociências* 32: 57-67.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS, Toldo Jr EE, Baitelli R. 2008a. Paleocanais como indicativo de eventos regressivos Quaternários do nível do mar no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica* 26: 367-375.
- Weschenfelder J, Medeanic S, Corrêa ICS, Aliotta S. 2008b. Holocene Paleoinlet of the Bojuru Region, Lagoa dos Patos, Southern Brazil. *Journal of Coastal Research* 24: 99-109.

Tables

Table 1 - Number of individuals and tissue vouchers of *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmanni* by locality. Numbers under the N column give the number of lizards collected and sequenced from each locality.

Species	Department/State – Province (Country)	Locality	Voucher	N	Coordinates
<i>L. arambarensis</i>	Rio Grande do Sul (Brazil)	(ITA) Viamão, State Park Itapuã	UFRGST (2636-2640)	5	30°23'01"S 51°01'17"W
		(BRI) Barra do Ribeiro	UFRGST (795-798, 811, 813-815)	8	30°24'43"S 51°13'03"W
		(TAP) Tapes	UFRGST (431-440)	10	30°38'15"S 51°22'29"W
		(ARA) Arambaré	UFRGST (477-485, 489)	10	30°54'14"S 51°29'28"W
<i>L. occipitalis</i>	Santa Catarina (Brazil)	(ING) Ingleses Beach	UFRGST (460-461, 463-465, 467-469)	8	27°26'47"S 48°22'24"W
		(JOA) Joaquina Beach	UFRGST (267-274)	8	27°36'33"S 48°27'20"W
		(CAM) Campeche Beach	UFRGST 476	1	27°41'35"S 48°29'05"W
		(GAR) Garopaba	UFRGST (456-459, 2547-2548)	6	28°06'12"S 48°38'36"W
		(FSM) Farol de Santa Marta	UFRGST (262-266)	5	28°36'11"S 48°49'03"W
		(MCO) Morro dos Conventos	UFRGST (253-254, 256, 258-260)	6	28°56'48"S 49°22'13"W
	Rio Grande do Sul (Brazil)	(TOR) Torres	UFRGST (245-249, 251-252)	7	29°22'45"S 49°45'32"W
		(CCA) Capão da Canoa	UFRGST (1542-1544)	3	29°42'04"S 49°58'51"W
		(CID) Cidreira	UFRGST (309-310, 448-451, 454-455)	8	30°06'11"S 50°10'38"W
		(PAL) Palmares do Sul	UFRGST 2212	1	30°33'20"S 50°24'21"W

<i>L. wiegmannii</i>		(MOS) Mostardas	UFRGST (292-300, 306)	10	31°08'06"S 50°49'50"W
		(SJM) São José do Norte	UFRGST (233-238, 240, 242-244)	10	32°07'13"S 52°03'29"W
		(RGR) Rio Grande	UFRGST (239, 276-282)	8	32°11'57"S 52°10'13"W
		(TAI) Taim	UFRGST (209-218)	10	32°36'47"S 52°25'12"W
		(SVP) Santa Vitória do Palmar	UFRGST (284-288)	5	33°36'33"S 53°12'14"W
		(CHU) Chuí, Barra do Chuí Balneary	UFRGST (289-290)	2	33°44'22"S 53°21'59"W
	Rocha (Uruguay)	(CHY) Chuy, Barra del Chuy Balneary	UFRGST (907-909)	3	33°45'26"S 53°23'15"W
		(STE) Castillos (Forte de Santa Teresa)	UFRGST 902	1	33°58'17"S 53°31'52"W
		(VAO) Valizas, left margin of the Valizas Creek	UFRGST (906, 3055)	2	34°20'01"S 53°47'28"W
	Rocha (Uruguay)	(VAW) Valizas, right margin of the Valizas Creek	UFRGST (865-870)	6	34°20'43"S 53°47'14"W
		(COS) Costa Azul	UFRGST (841-844, 846, 849-851, 860)	9	34°37'32"S 54°09'03"W
		(LAP) La Paloma	UFRGST (827, 829-830, 832-836)	8	34°39'34"S 54°12'31"W
	Colonia (Uruguay)	(COL) Campamento Artigas	UFRGST (566-569, 571, 573-575)	8	34°26'30"S 57°11'05"W
	Gral. Pedernera - San Luis (Argentina)	(SLU) Estância El Centenario	UFRGST (1763-1765, 1767-1768, 1770-1773)	9	34°13'51"S 65°56'56"W
	Hucal – La Pampa (Argentina)	(HUC) National Roud154, 40,1 Km S junction National Roud 35 (Km 40), 52	LJAMM (10925-10927)	3	38°05'54"S 64°04'11"W
	Utracán – La Pampa (Argentina)	(UTR) Nacional Roud 35, Km 257, 6 km N Padre Angel Buodo	LJAMM-CNP 3096 (agora BYU 48116) LJAMM-CNP 3097 (agora MLP.S 2479) LJAMM-CNP 3200	3	37°14'44"S 64°17'11"W
Marcos Juárez – Córdoba (Argentina)	(COR) General Roca, National Roud 35, 56,8 km N Realicó, 28 km N Huinca Renancó, 15 km S road junction to Nicolas Bruzzone, 196	LJAMM-CNP 13300	1	34°34'34"S 64°22'36"W	

Table 2 - Measures of genetic variability (n: number of analyzed sequences; H(freq): haplotype (absolute frequency); S: number of polymorphic sites; Hd: haplotype diversity; π : nucleotide diversity) and Neutrality Tests related to population expansion (Tajima's D e Fu's F_s) of the *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmannii* sampled populations. Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analysis. Locality abbreviations match those in Table 1. All pop – all populations of the species; Groups I-IV – groups resulting from the programs SAMOVA and BAPS to *L. occipitalis* (Group I: ING+JOA; Group II: FSM+MCO; Group III: TOR+MOS+SJN+RGR; Group IV: GAR+CID+TAI+SVP); Ar – Argentinean populations of *L. wiegmannii*; Uy – Uruguayan populations of *L. wiegmannii*; Uy Atlantic – Uruguayan populations of *L. wiegmannii* from Atlantic coast.

Species	Locality	n	H(freq)	S	Hd	π (per site)	D	F_s
<i>L. arambarensis</i>	ITA	5	H1La(1) H2La(4)	1	0.400 +- 0.237	0.0003 +- 0.0004	-0.82	0.09
	BRI	8	H5La(1) H6La(2) H7La(1) H8La(1) H9La(1) H10La(2)	12	0.929 +- 0.084	0.0031 +- 0.0019	-0.61	-0.92
	TAP	10	H3La(10)	0	0	0	0	0
	ARA	10	H4La(10)	0	0	0	0	0
	All pop	33		17	0.814 +- 0.044	0.0022 +- 0.0013	-1.01	-1.31
<i>L. occipitalis</i>	ING	8	H1Lo+H2Lo(4) H3Lo(4)	1	0.571 +- 0.095	0.0004 +- 0.0005	1.44	0.97
	JOA	8	H4Lo(4) H5Lo(2) H6Lo(2)	6	0.714 +- 0.123	0.0020 +- 0.0014	0.52	2.15
	CAM	1	H7Lo(1)	-	-	-	-	-
	GAR	6	H8Lo(6)	0	0	0	0	0
	FSM	5	H9Lo(1) H10Lo(3) H11Lo(1)	0	0.700 +- 0.218	0.0012 +- 0.0010	-1.09	0.28
	MCO	6	H12Lo+H13Lo(5) H14Lo(1)	2	0.600 +- 0.215	0.0005 +- 0.0005	-1.13	-0.86
	TOR	7	H15Lo(5) H16Lo(1) H17Lo(1)	12	0.524 +- 0.209	0.0040 +- 0.0025	0.27	3.60
	CCA	3	H18Lo(2) H19Lo(1)	-	-	-	-	-
	CID	8	H20Lo(2) H21Lo(2) H22Lo(1) H23Lo(1) H24Lo(1) H25Lo(1)	5	0.929 +- 0.084	0.0012 +- 0.0009	-0.92	-3.37*
	PAL	1	H20Lo(1)	-	-	-	-	-
	MOS	10	H26Lo(1) H27Lo(2) H28Lo(2) H29Lo(1) H30Lo(1) H31Lo(1) H32Lo(1) H33Lo(1)	18	0.956 +- 0.059	0.0030 +- 0.0019	-1.83*	-2.73*
	SJN	10	H28Lo(6) H34Lo(2) H35Lo(1) H36Lo(1)	10	0.644 +- 0.151	0.0017 +- 0.0011	-1.73*	0.76
	RGR	8	H37Lo(3) H38Lo(3) H39Lo(1) H40Lo(1)	18	0.786 +- 0.113	0.0061 +- 0.0036	0.71	3.46
	TAI	10	H41Lo(7) H42Lo(1) H43Lo(1) H44Lo(1)	17	0.533 +- 0.180	0.0026 +- 0.0017	-2.02**	1.87
	SVP	5	H45Lo(2) H46Lo(2) H47Lo(1)	3	0.800 +- 1.164	0.0012 +- 0.0010	0.70	0.28
	CHU	2	H48Lo(2)	-	-	-	-	-
	CHY	3	H49Lo+H50Lo(3)	-	-	-	-	-
	STE	1	H51Lo(1)	-	-	-	-	-
	VAO	2	H41Lo(2)	-	-	-	-	-
	All pop	104		61	0.962 +- 0.007	0.0080 +- 0.0041	-0.46	-7.16
	Group I	16		7	0.633 +- 0.074	0.0022 +- 0.0014	1.21	4.07
	Group II	11		8	0.764 +- 0.107	0.0017 +- 0.0012	-0.83	-0.19

<i>L. wiegmanni</i>	Group III	35		31	0.923 +- 0.029	0.0037 +- 0.0021	-1.26	-5.66*
	Group IV	29		25	0.870 +- 0.038	0.0029 +- 0.0017	-1.44	-1.41
	VAW	6	H2Lw(6)	0	0	0	0	0
	COS	9	H2Lw(5) H3Lw(4)	1	0.556 +- 0.090	0.0004 +- 0.0005	1.40	1.02
	LAP	8	H2Lw(8)	0	0	0	0	0
	COL	8	H4Lw(1) H5Lw(4) H6Lw(1) H7Lw(1) H8Lw(1)	9	0.786 +- 0.151	0.0024 +- 0.0016	-0.77	-0.34
	SLU	9	H9Lw(2) H10Lw(3) H11Lw(1) H12Lw(1) H13Lw(1) H14Lw(1)	8	0.889 +- 0.091	0.0018 +- 0.0012	-1.11	-1.90
	HUC	3	H15Lw(1) H16Lw(1) H17Lw(1)	-	-	-	-	-
	UTR	3	H10Lw(1) H18Lw(1) H19Lw(1)	-	-	-	-	-
	COR	1	H20Lw(1)	-	-	-	-	-
	All pop	47		41	0.756 +- 0.066	0.0091 +- 0.0047	0.63	4.16
	Ar	16		8	0.889 +- 0.091	0.0018 +- 0.0012	-1.11	-1.90
	Uy	31		12	0.607 +- 0.092	0.0023 +- 0.0014	-0.12	0.80
Uy Atlantic	23		1	0.300 +- 0.105	0.0002 +- 0.0003	0.19	0.61	

* P < 0.05; ** P < 0.001

Table 3 – TMRCA of mtDNA lineages for *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis*, *L. wiegmanni* and its major clades. kya – kilo years ago.

Species/clades	TMRCA (credible interval) (kya)
Root	3720465 (2322144 – 5996010)
<i>L. arambarensis</i> X <i>L. occipitalis</i>	2239841 (1349612 – 3605126)
<i>L. arambarensis</i>	147013 (69716 – 260026)
<i>L. occipitalis</i>	335239 (185574 – 554531)
Locci1	121279 (50364 – 226355)
Locci2	101309 (41331 – 194449)
Locci3	103419 (51634 – 183464)
Locci4	154789 (83658 – 262143)
<i>L. wiegmanni</i>	525981 (290405 – 883878)
Lwieg1	133831 (59821 – 244362)
Lwieg2	129750 (62664 – 228481)

Table 4 - Pair-to-pair comparisons of Φ_{ST} values obtained from the distance between haplotypes of the concatenated genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) and Cytochrome b (Cytb) for *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmannii*. Locality abbreviations match those in Table 1. Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analysis.

		1	2	3	4								
<i>L. arambarensis</i>	1-ITA	-											
	2-BRI	0.430**	-										
	3-TAP	0.976**	0.608**	-									
	4-ARA	0.970**	0.498**	1.000**	-								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>L. occipitalis</i>	1-ING	-											
	2-JOA	0.669**	-										
	3-GAR	0.975**	0.894**	-									
	4-FSM	0.936**	0.857**	0.927**	-								
	5-MCO	0.964**	0.896**	0.971*	0.651*	-							
	6-TOR	0.841**	0.785**	0.720**	0.679**	0.762**	-						
	7-CID	0.919**	0.859**	0.723**	0.811**	0.870**	0.629*	-					
	8-MOS	0.861**	0.815**	0.786**	0.734**	0.798**	0.091	0.727**	-				
	9-SJN	0.914**	0.866**	0.876**	0.822**	0.873**	0.140*	0.807**	-0.017	-			
	10-RGR	0.753**	0.703**	0.612**	0.578**	0.658**	0.067	0.535**	0.089	0.127	-		
	11-TAI	0.859**	0.807**	0.662**	0.754**	0.815**	0.589**	0.387**	0.684**	0.751**	0.502**	-	
	12-SVP	0.940**	0.863**	0.898**	0.875*	0.924**	0.703**	0.638**	0.779**	0.856**	0.592**	0.279**	-
		1	2	3	4	5							
<i>L. wiegmannii</i>	1-VAW	-											
	2-COS	0.305	-										
	3-LAP	0.000	0.354	-									
	4-COL	0.697**	0.714**	0.731**	-								
	5-SLU	0.948**	0.947**	0.955**	0.902**	-							

*P < 0.05; **P < 0.001

Table 5 - Analysis of molecular variance (AMOVA) among *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* and *L. wiegmannii* mtDNA haplotypes from the concatenated genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) and Cytochrome b (Cytb) performed for different hierarchical geographic levels: *L. arambarensis* – One group: populations together in one group. *L. occipitalis* - One group: populations together in one group; Seven groups: considering all populations subdivided into seven groups taking into account the permanent geographical discontinuities in the range; Four groups: all populations subdivided into four groups resulting from the programs SAMOVA and BAPS. *L. wiegmannii* – One group: populations together in one group; Two groups: considering all populations subdivided into two groups taking into account the permanent geographical discontinuity in the range; Three groups: all populations subdivided into three groups resulting from the programs SAMOVA and BAPS. AG: among groups; AP/ WG: among populations/ within groups; WP: within populations. Populations with less than five sampled individuals were excluded from the analysis.

Species	Hierarchical level (Fixation Index)	Percentage of variability		
		One group	Seven groups	Four groups
<i>L. arambarensis</i>	AP/ WG	One group		
	WP	70.62		
	(Φ_{st})	29.38		
<i>L. occipitalis</i>	AG	One group	Seven groups	Four groups
	AP/ WG	-	40.65	68.03
	WP	76.51	37.11	12.11
	(Φ_{ct})	23.49	22.24	19.86
	(Φ_{sc})	-	0.41*	0.68**
	(Φ_{st})	-	0.63**	0.38**
<i>L. wiegmannii</i>	AG	One group	Two groups	Three groups
	AP/ WG	-	86.24	93.25
	WP	90.78	9.01	-0.13
	(Φ_{ct})	9.22	4.75	6.87
	(Φ_{sc})	-	0.86**	0.93**
	(Φ_{st})	-	0.65**	-0.02*
		0.91**	0.95**	0.93**

* P < 0.05; ** P < 0.001

Table 6 – Correlation coefficient (r) between genetic and geographical distances of the *Liolaemus arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmannii* sampled populations. RS+Uy – populations of *L. occipitalis* from Rio Grande do Sul and Uruguay; SC – populations of *L. occipitalis* from Santa Catarina; Ar – Argentinean populations of *L. wiegmannii* ; Uy – Uruguayan populations of *L. wiegmannii* ; Uy Atlantic – Uruguayan populations of *L. wiegmannii* from Atlantic coast.

Species		r
<i>L. arambarensis</i>	All populations	0.364**
	All populations	0.345**
<i>L. occipitalis</i>	RS+Uy	0.157**
	SC	0.825**
	All populations	0.949**
<i>L. wiegmannii</i>	Ar	0.137
	Uy	0.892**
	Uy Atlantic	-0.126*

*P < 0.05; ** P < 0.001

Figures

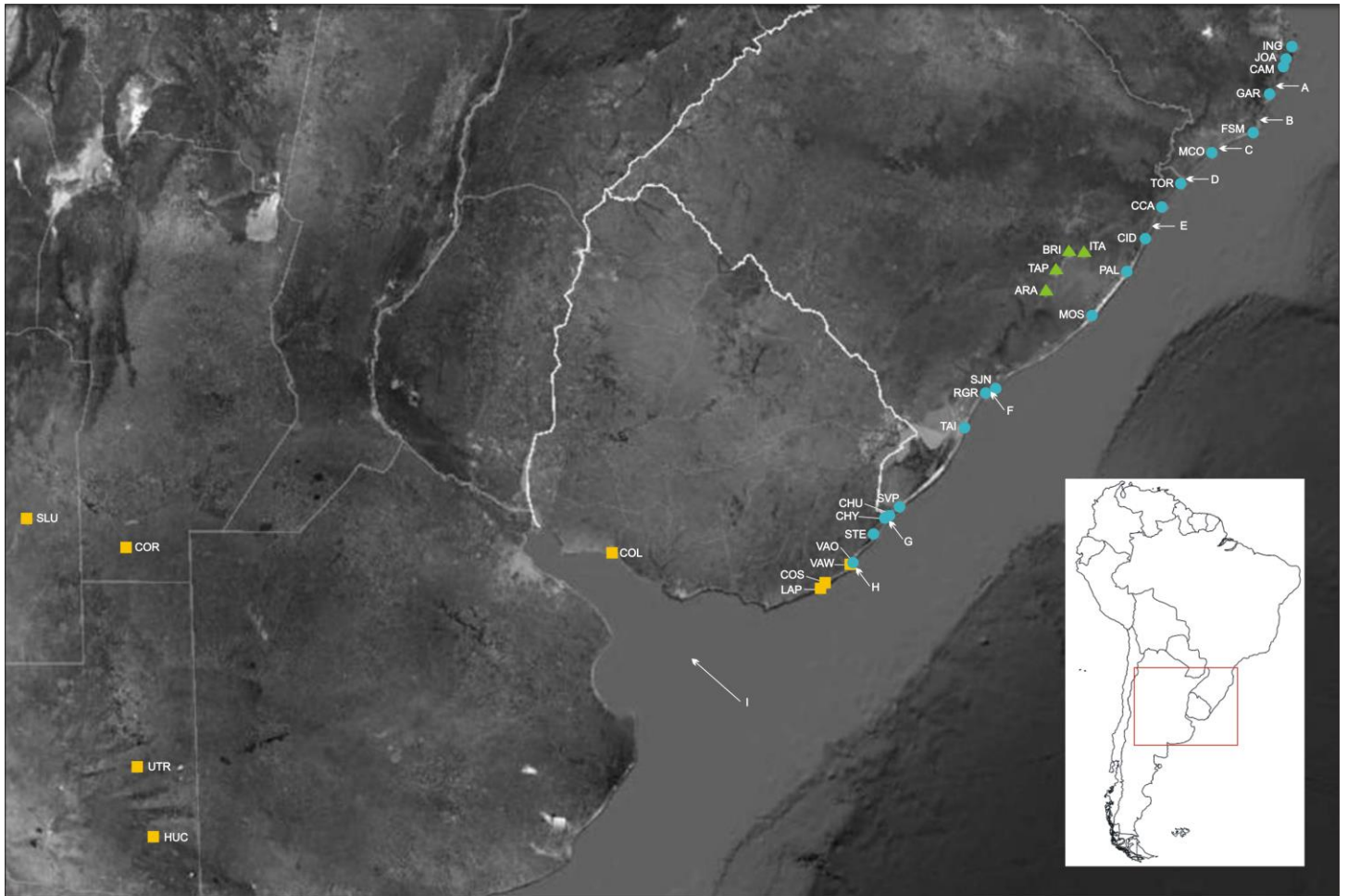
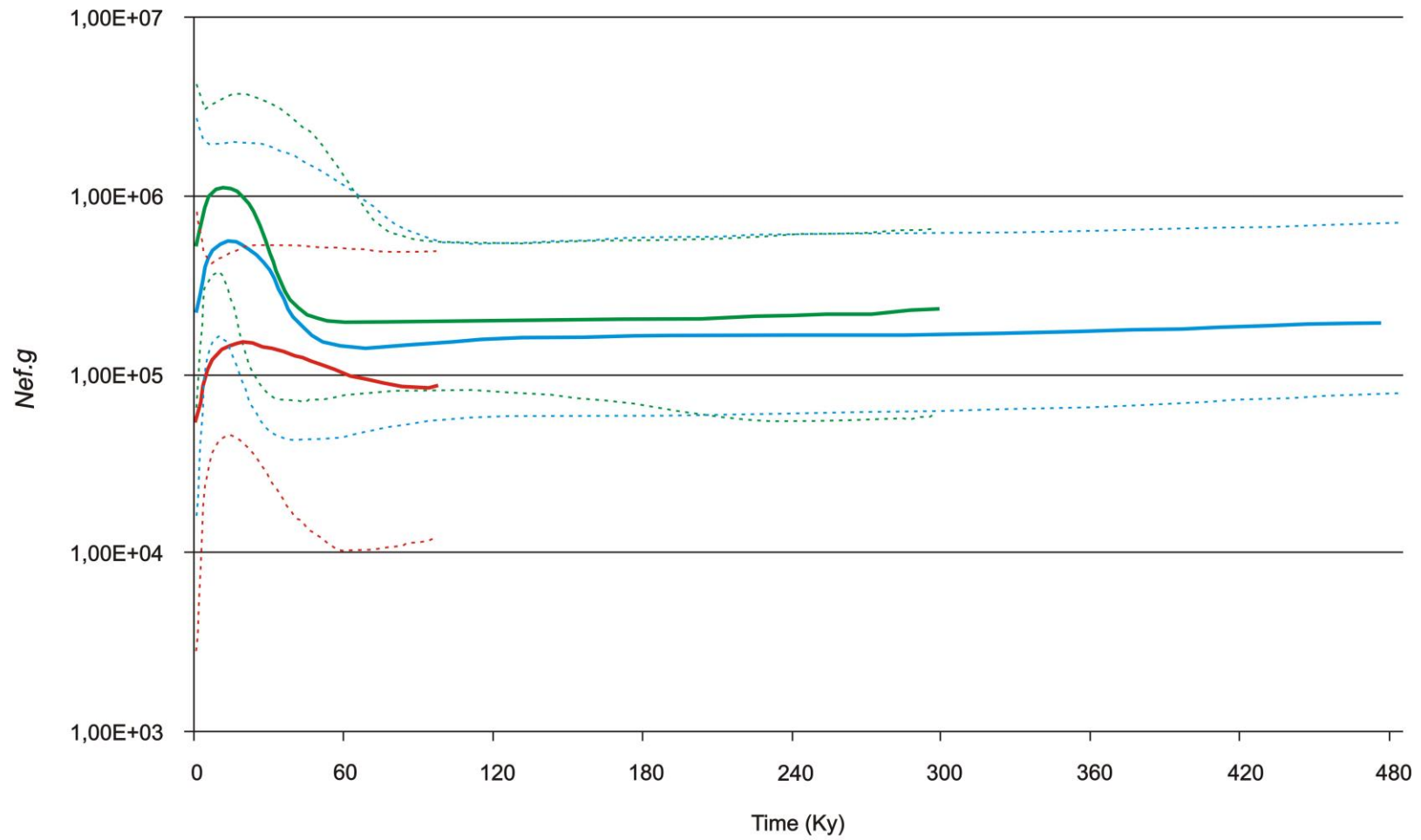
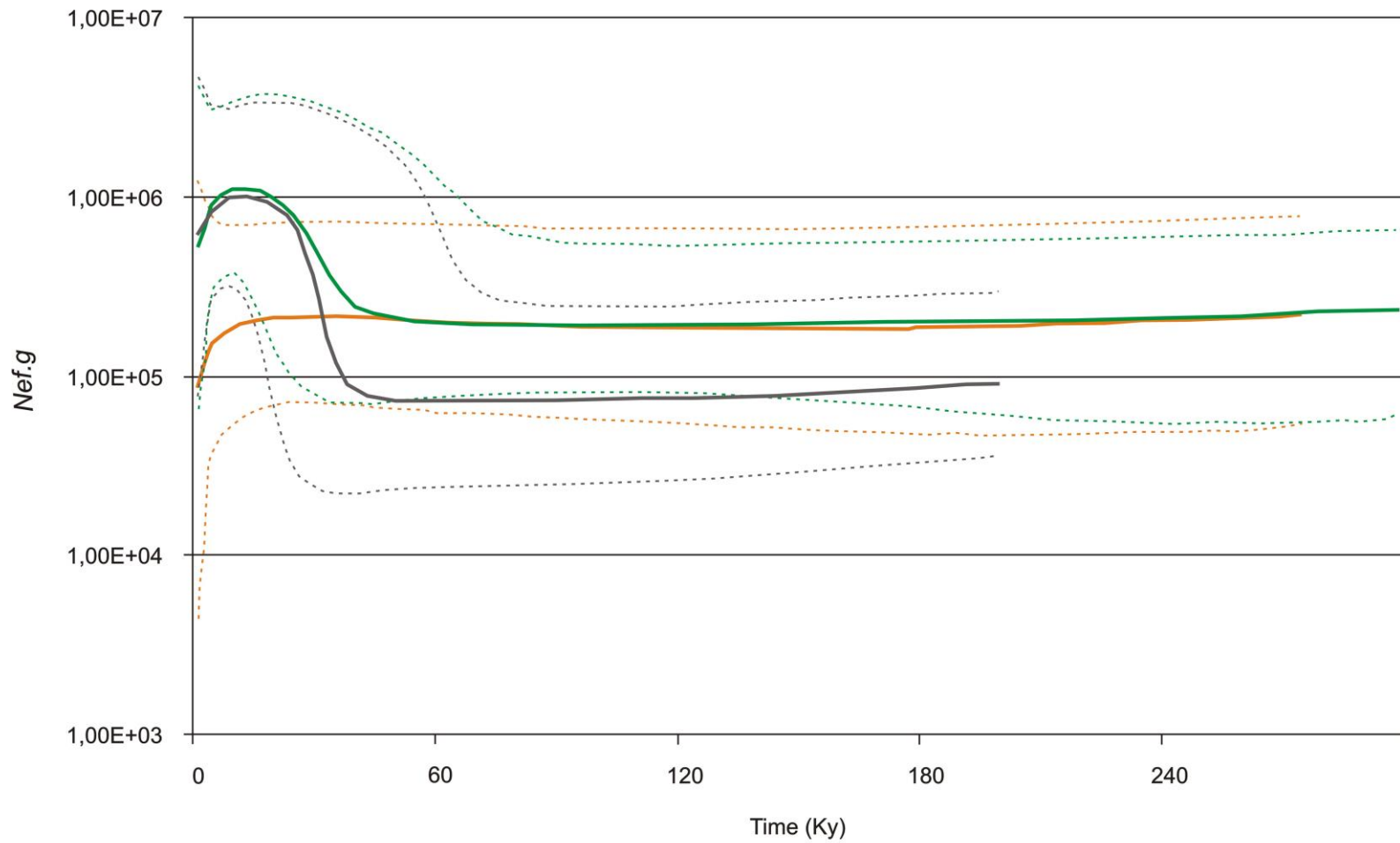


Figure 1 - Sampling localities of *Liolaemus arambarensis* (green triangles), *L. occipitalis* (blue circles) and *L. wiegmanni* (yellow squares). Locality: (ING) Ingleses Beach, (JOA) Joaquina Beach, (CAM) Campeche Beach, (GAR) Garopaba, (FSM) Farol de Santa Marta, (COM) Morro dos Conventos, (TOR) Torres, (CCA) Capão da Canoa, (CID) Cidreira, (PAL) Palmares do Sul, (MOS) Mostardas, (ITA) Itapuã, (BRI) Barra do Ribeiro, (TAP) Tapes, (ARA) Arambaré, (SJN) São José do Norte, (RGR) Rio Grande, (TAI) Taim, (SVP) Santa Vitória do Palmar, (CHU) Chuí (Barra do Chuí Balneary), (CHY) Chuy (Barra del Chuy Balneary), (STE) Castillos (Forte de Santa Teresa), (VAO), Valizas (left margin of the Valizas Creek), (VAW) Valizas (right margin of the Valizas Creek), (COS) Costa Azul, (LAP) La Paloma, (COL) Colonia del Sacramento (Campamento Artigas), (SLU) San Luis (Estância El Centenário), (COR) Cordoba (Gral. Roca, Ruta Nacional 35), (UTR) Utracán (Ruta Nacional 35), (HUC) Hucal (Ruta Nacional 154). Barriers: A - Atlantic Ocean, B - bar of Laguna, C - Araranguá River, D - Mampituba River, E - Tramandaí River, F - bar of Rio Grande, G - Chuí Creek, H - Valizas Creek, I - La Plata River.



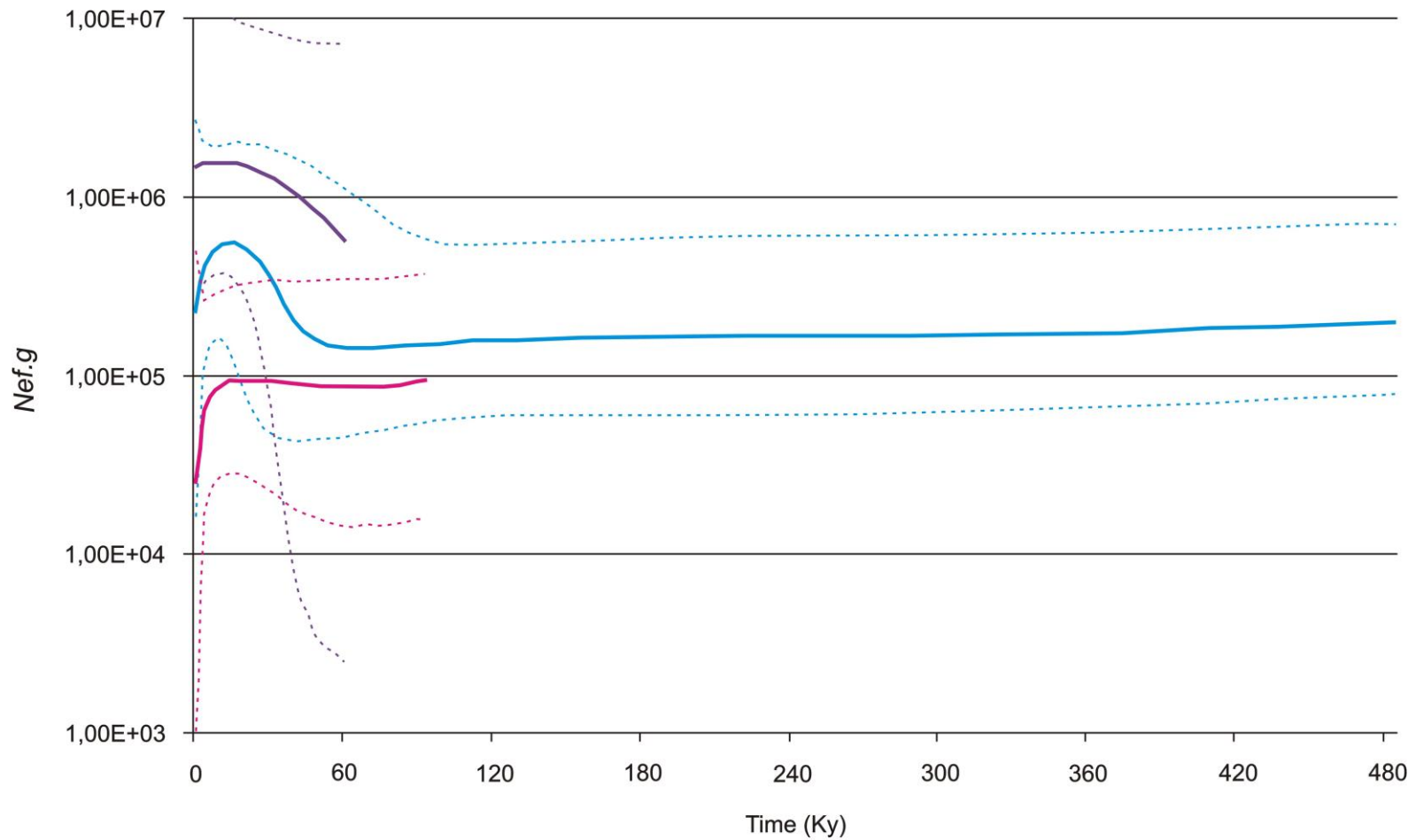
a

Figura 2a – Bayesian Skyline Plot showing the change in population size ($Nef \times$ generation time (g)) at time (Ky) in *Liolaemus arambarensis* (red line), *L. occipitalis* (green line) and *L. wiegmannii* (blue line). Solid lines represent the median, and dashed lines the confidence intervals.



b

Figura 2b – Bayesian Skyline Plot showing the change in population size ($Nef \times g$) at time (Ky) in *Liolaemus occipitalis*: all populations (green line), populations from SC (orange line) and populations from RS plus Uruguay (grey line). Solid lines represent the median, and dashed lines the confidence intervals.



c

Figura 2c – Bayesian Skyline Plot showing the change in population size ($Nef \times g$) at time (Ky) in *Liolaemus wiegmanni*: all populations (blue line), populations from Argentina (purple line) and populations from Uruguay (pink line). Solid lines represent the median, and dashed lines the confidence intervals.

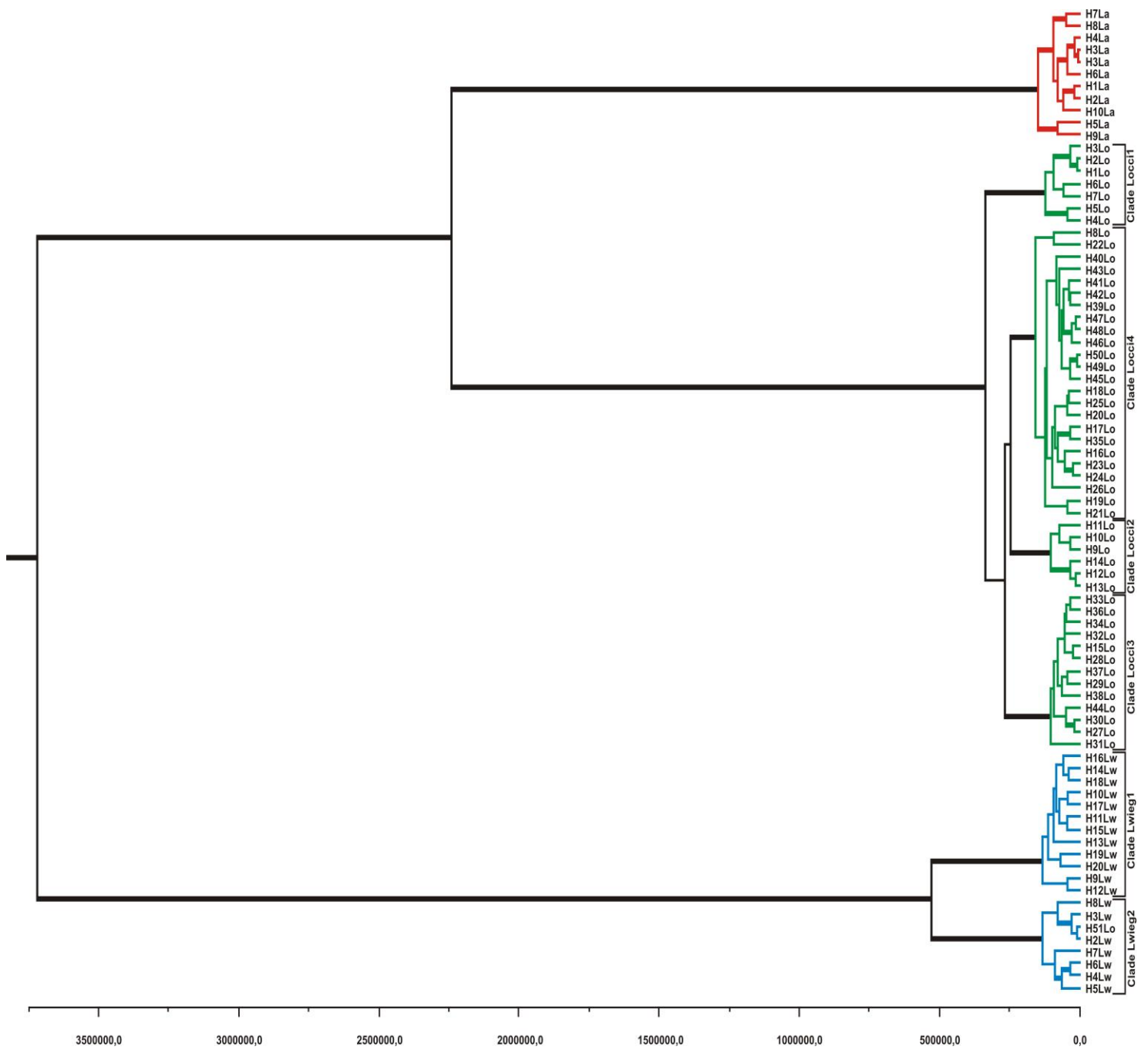
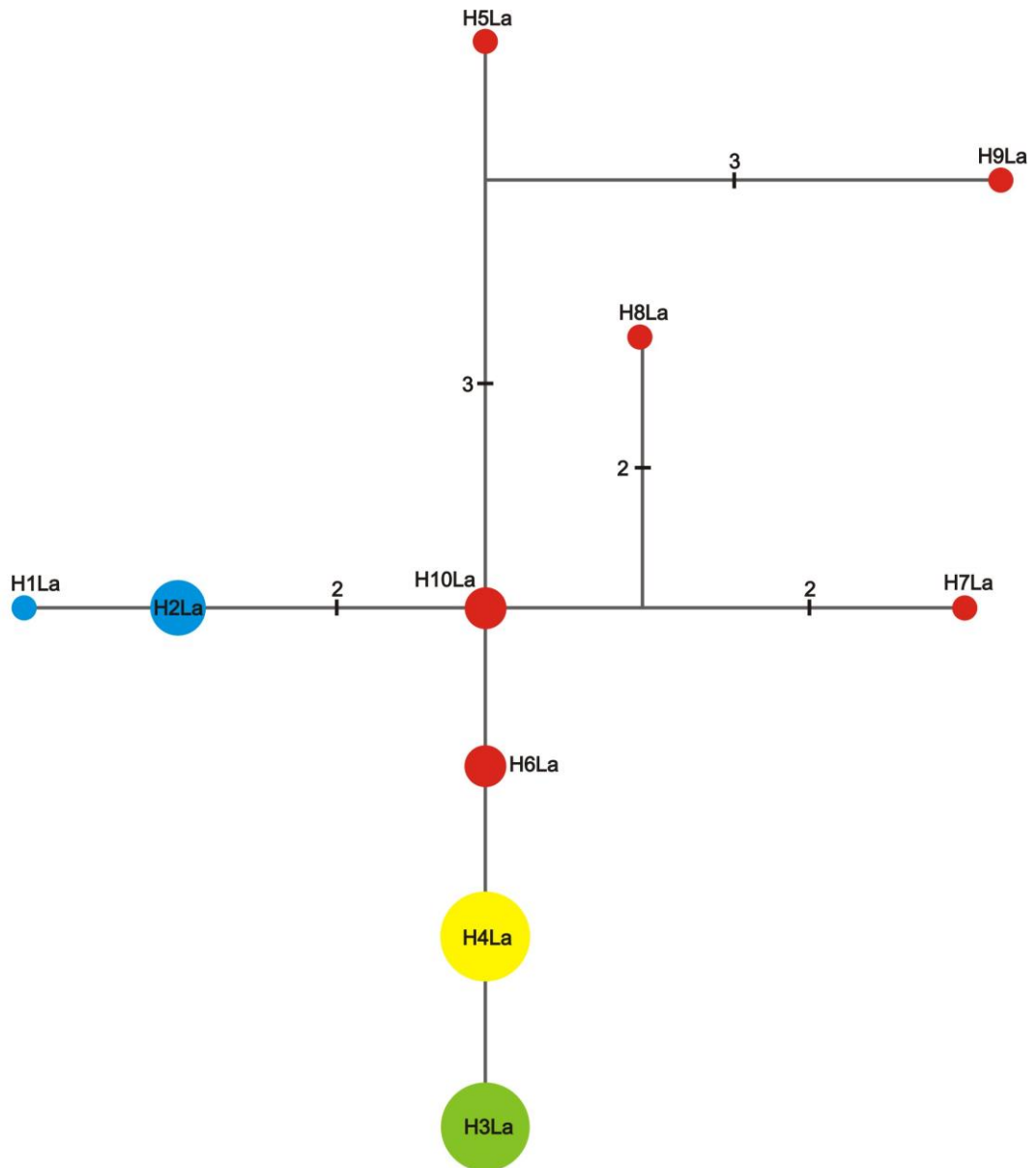
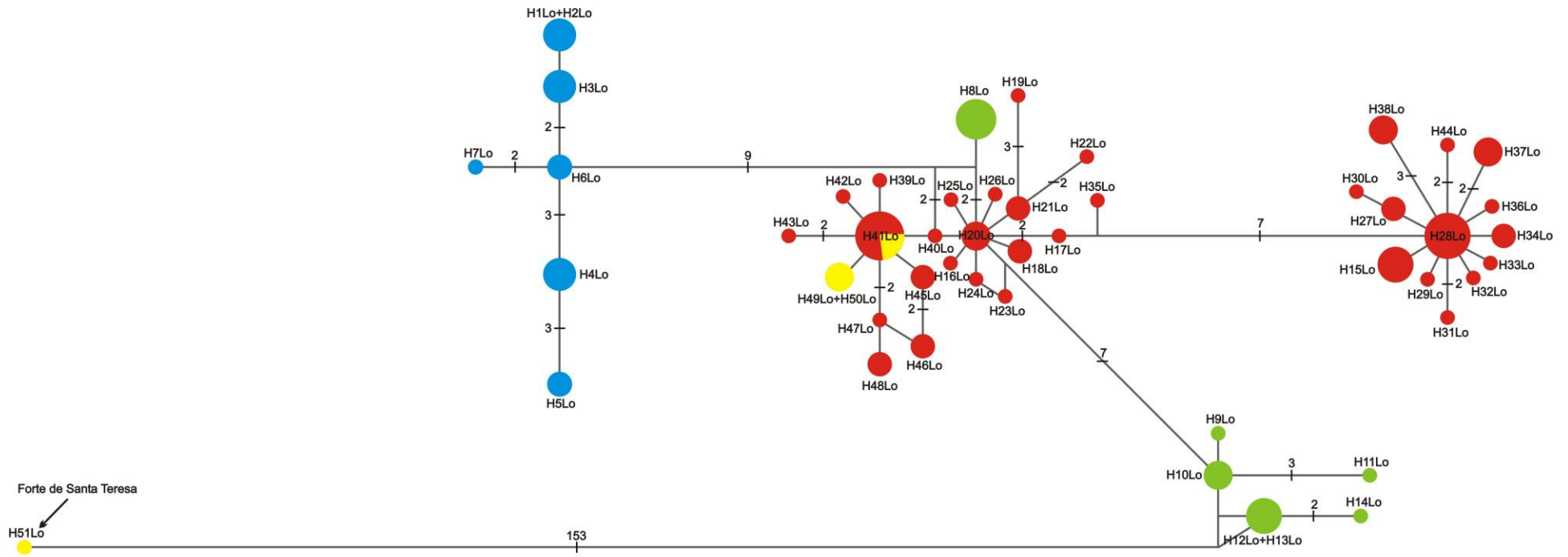


Figure 3 - Bayesian tree of haplotypes of the concatenated mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase Subunit 1 and Cytochrome b of *Liolaemus arambarensis* (red), *L. occipitalis* (green) and *L. wiegmannii* (blue). Thicker branches have posterior probability values (PP) between 0.9 and 1.0.



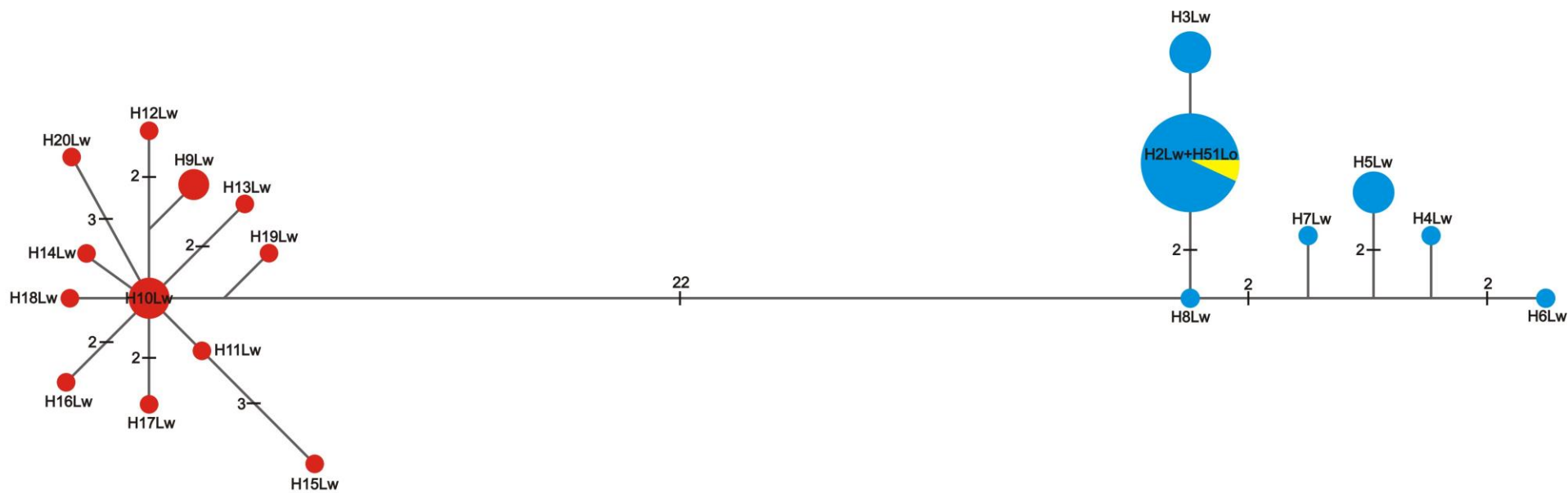
a

Figure 4a - Haplotype relationships obtained according to the *Median-Joining* algorithm for *Liolaemus arambarensis* (n = 33): Barra do Ribeiro population (red circles), Arambaré population (yellow circles), Itapuã population (blue circles), Tapes population (green circles). A single mutation between haplotypes (H) is not indicated; more than one mutation is indicated by a black rectangle together with the number of existing mutations.



b

Figura 4b – Haplotype relationships obtained according to the Median-Joining algorithm for *Liolaemus occipitalis* (n = 104): SC continental populations (green circles), SC island populations (blue circles), Uruguayan populations (yellow circles), RS populations (red circles). A single mutation between haplotypes (H) is not indicated; more than one mutation is indicated by a black rectangle together with the number of existing mutations.



c

Figura 4c – Haplotype relationships obtained according to the *Median-Joining* algorithm for *Liolaemus wiegmanni* ($n = 47$): *L. occipitalis* from STE population (yellow circle), Uruguayan populations (blue circles), Argentinean populations (red circles). A single mutation between haplotypes (H) is not indicated; more than one mutation is indicated by a black rectangle together with the number of existing mutations.

IV. Discussão Geral

Neste estudo foram feitas inferências sobre os padrões filogeográficos de três espécies do gênero *Liolaemus*: *L. arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmanni*. Para isso foram caracterizadas a variabilidade genética e a diferenciação geográfica de cada uma das três espécies. Procurou-se discutir os principais aspectos da história evolutiva de cada uma delas, da distribuição espacial das principais linhagens filogenéticas encontradas, e também inferir os principais fatores que teriam influenciado a divergência genética observada. É importante ressaltar que cada uma das localidades de coleta foi considerada como sendo uma população (embora não tenha sido seguido à risca o conceito ecológico de população).

Os principais dados obtidos foram descritos e discutidos de forma independente em cada um dos capítulos precedentes. A seguir serão apresentados os principais pontos discutidos ao longo do trabalho.

No Capítulo I sobre *L. occipitalis* procurou-se tratar a diversidade genética da espécie num contexto de conservação da mesma. Nossos resultados sugeriram um complexo padrão de ocupação da espécie em sua atual área de distribuição, com sinais de expansão populacional recente somente ao sul do rio Mampituba. Resultados de vários dos testes realizados nos mostraram a ausência de relação entre a estrutura populacional e as atuais barreiras geográficas da área de ocorrência de *L. occipitalis*. A ausência de haplótipos compartilhados entre as populações ao sul e ao norte do rio Mampituba, porém, nos sugere que esta talvez seja uma das únicas barreiras geográficas atuais que influenciou a estrutura genética observada na espécie.

As populações ao sul do rio Mampituba compreendem dois grupos haplotípicos com claros sinais de expansão, e que, provavelmente, representam haplótipos remanescentes de um *pool* gênico maior. Ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS), onde coexistem estes dois grupos haplotípicos, destaca-se a parte central da região como um possível centro de origem e de expansão da

espécie. Resultados que sustentam esta hipótese são a alta diversidade apresentada pelas populações do local, e o fato de que os haplótipos mais frequentes e amplamente espalhados na PCRS são encontrados nestas populações. Em relação às populações ao norte do rio Mampituba, observou-se que nenhum dos dois grupos haplotípicos nos quais elas se dividem apresentaram os mesmos sinais de expansão que os grupos ao sul do rio. O grupo de populações da ilha de Santa Catarina, particularmente, apresentou em diversas análises realizadas evidências de isolamento genético, podendo, desta forma, ser considerado como uma importante fonte de diversidade genética para *L. occipitalis*.

De forma geral, pode-se dizer que a variabilidade genética e a distribuição geográfica observadas entre as populações de *L. occipitalis* foram moldadas em boa parte pela evolução geológica da costa uruguaia, gaúcha e catarinense, bem como pelas pressões antrópicas ao longo de sua área de ocorrência. No entanto, essa mesma pressão antrópica que possivelmente ajudou a moldar o atual cenário genético da espécie está, sem dúvida, entre as principais causas do desaparecimento de muitas de suas populações. Sabe-se que muitas das áreas onde as populações de *L. occipitalis* ocorrem estão desaparecendo e gerando descontinuidades em sua distribuição, o que terá um impacto imenso sobre a espécie em termos de perda de diversidade genética. Alertando para o estado alarmante de conservação das dunas costeiras do extremo sul do Brasil, também existem outros estudos com diferentes espécies que habitam a mesma área de *L. occipitalis* (Fernández-Stolz *et al.*, 2007; Mäder, 2008).

O Capítulo II aborda de forma comparativa aspectos dos padrões filogeográficos de *L. arambarensis*, *L. occipitalis* e *L. wiegmannii*, inferindo possíveis datas de origem do ancestral comum de cada uma delas (TMRCA), de suas atuais linhagens mitocondriais, e da divergência entre elas.

Nossos resultados demonstram a existência de uma estruturação filogenética dentro de cada uma das três espécies estudadas. E de acordo com nossas estimativas, os TMRCA das espécies, dos clados intra-específicos e das divergências

entre as espécies caem no Pleistoceno, embora o intervalo de confiança para a divergência entre *L. arambarensis* e *L. occipitalis* atinja o Plioceno também. Observou-se, interessante, que a separação das linhagens que deram origem a estas duas espécies teria ocorrido muito antes dos eventos climáticos pleistocênicos que originaram a PCRS há ~400 kya, sugerindo que a linhagem que originou *L. occipitalis* seja muito mais antiga do que a unidade geomorfológica onde a maioria de suas populações é encontrada atualmente. A similaridade entre os valores de TMRCAs encontrados para os diferentes clados e para *L. arambarensis* sugere que *L. occipitalis* e *L. wiegmanni* possam ter mantido um tamanho populacional efetivo similar para suas subpopulações em um modelo de metapopulação geograficamente estruturado; enquanto que a distribuição restrita de *L. arambarensis* fez com que o tamanho efetivo da espécie fosse similar àquele encontrado em uma subpopulação genética de espécies mais amplamente distribuídas.

Embora existam populações de *L. occipitalis* localizadas fora da PCRS, a divergência entre seus clados ocorreu próximo do início da formação desta unidade geomorfológica. Entretanto, é possível que estas datas indiquem o estabelecimento de populações geograficamente divergentes que sejam associadas ao início da formação e expansão da planície costeira. Para *L. wiegmanni*, a divergência de seus dois subclados (populações da costa uruguaia e populações da Argentina) pode estar associada com a formação do sistema do rio da Prata.

Para *L. arambarensis* verificou-se a inegável importância da população de Barra do Ribeiro em termos de conservação do *pool* gênico da espécie, bem como a hipótese de que esta seria a população que serviu como "fonte" para a fundação das demais. Nossas estimativas sugerem que não há evidências de expansão populacional recente para a espécie, implicando em uma antiga estabilidade numa dinâmica de fonte-sumidouro, a qual pode ser característica de *L. arambarensis*.

Em relação à estrutura filogenética de *L. wiegmanni*, nossos dados sustentam uma forte divergência entre uma linhagem filogenética argentina e uma uruguaia, separadas pelo rio da Prata, também existindo uma estruturação dentro do clado

uruguaio considerando a população de Colonia (costa platense) e as três populações da costa Atlântica. Embora com suporte modesto, nossos dados sugerem que os haplótipos de Colonia são parafiléticos em relação àqueles do grupo das populações atlânticas, indicando uma possível rota de migração sudoeste-nordeste ao longo da recente costa Atlântica. Observou-se na população argentina de San Luis níveis de diversidade similares aos da população uruguaia de Colonia, mas ambas apresentaram-se muito mais diversas do que qualquer população da costa Atlântica. Similarmente ao observado para *L. arambarensis*, isto poderia indicar um efeito fundador durante a colonização da costa Atlântica uruguaia ou que estas populações com menor diversidade mantêm um tamanho efetivo menor do que as populações de Colonia e de San Luis. Nossos dados sugerem um sinal de expansão populacional recente para *L. wiegmannii*, mas não foi possível demonstrar se este sinal foi exclusivo para as populações uruguaias ou argentinas.

Liolaemus occipitalis, como já apresentado no Capítulo I, estrutura-se em quatro grupos haplotípicos bem definidos (dois ao norte e dois ao sul do rio Mampituba), embora suas relações filogenéticas não possam ser inferidas com certeza. Além de acrescentarmos novas informações ao já apresentado no Capítulo I sobre *L. occipitalis*, no presente capítulo foram feitas inferências em relação aos TMRCA da espécie e de suas linhagens mitocondriais, bem como sua história demográfica.

Observou-se em *L. occipitalis* evidência de expansão populacional há ~40 kya, entretanto, esta parece restrita às populações do RS e Uruguai, com as populações catarinenses demonstrando estabilidade em relação ao seu tamanho. Talvez este quadro reflita o ambiente ocupado pelos diferentes grupos populacionais, com as praias catarinenses mais restritas e com diversas barreiras naturais entre populações adjacentes, e as praias do RS permitindo uma maior conectividade entre as populações e com maior disponibilidade de habitats permitindo tamanhos populacionais maiores.

Também se discutiu o fato de uma população catarinense (Garopaba) apresentar um haplótipo de um clado do RS e Uruguai (Locci4), sendo esta população

claramente distante geograficamente das gaúchas e uruguaias, e este haplótipo ser notavelmente distinto dos demais deste clado. Uma hipótese para este curioso padrão é que os clados de *L. occipitalis* estavam mais amplamente distribuídos, com Locci4 tornando-se extinto ao sul de SC, mas não na população de Garopaba. Esta explicação hipotética baseia-se na instabilidade da PCRS na provável época de surgimento do ancestral comum mais recente de *L. occipitalis* (~330 kya), sendo que esta instabilidade pode ter desempenhado um importante papel na dinâmica de extinção/re-colonização que afetou a distribuição dos clados ao longo da área de distribuição da espécie. Esta instabilidade natural e a natureza mutante da região de ocorrência da maioria das populações de *L. occipitalis* também são levantadas como hipótese para explicar a ausência de relação entre as barreiras geográficas naturais existentes na área e a estruturação populacional.

O intervalo existente entre a expansão observada em *L. occipitalis* e *L. wiegmanni* (~40 kya) e o terceiro ciclo deposicional que implantou as restingas que delimitaram a Laguna dos Patos (~120 kya), pode indicar que não somente a formação da PCRS foi importante na determinação do tamanho populacional, mas também os eventos climáticos que afetaram estas taxa, com a disponibilidade de habitat limitando a expansão em SC.

V. Referências Bibliográficas

Formatado segundo as regras do periódico *Zoological Journal of the Linnean Society*

Abdala CS. 2007. Phylogeny of the *boulengeri* group (Iguania: Liolaemidae, *Liolaemus*) based on morphological and molecular characters. *Zootaxa* 1538: 1-84.

Abdala CS, Quinteros S, Espinoza RE. 2008. Two new species of *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) from the Puna of northwestern Argentina. *Herpetologica* 64: 458-471.

- Abreu JGN, Calliari LJ. 2005. Paleocanais na Plataforma Continental Interna do Rio Grande do Sul: Evidências de uma Drenagem Fluvial Pretérita. *Revista Brasileira de Geofísica* 23: 123-132.
- Aguilar CG, Mesa V, Alvez MC. 2010. Sinopsis Geológico-Ambiental de la Costa Platense y Atlántica de Uruguay. In: López RA, Marcomini SC, orgs. *Problemática de los Ambientes Costeros: Sur de Brasil, Uruguay y Argentina*. Buenos Aires: Editorial Croquis, 57-74.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Alfaro ME, Zoller S, Lutzoni F. 2003. Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. *Molecular Biology and Evolution* 20: 255–266.
- Amos WE, Harwood J. 1998. Factors Affecting Levels of Genetic Diversity in Natural Populations. *Philosophy Transaction Royal Society London of Biology* 353: 77-186.
- Angulo RJ, Lessa GC, de Souza MC. 2006. A critical review of mid- to late-Holocene sea-level fluctuations on the eastern Brazilian coastline. *Quaternary Science Reviews* 25: 486–506.
- Avila LJ, Perez CHF, Morando M. 2003. A new species of *Liolaemus* (Squamata: Iguania: Liolaemidae) from northwestern Patagonia (Neuquén, Argentina). *Herpetologica* 59: 532–543.
- Avila LJ, Morando M, Perez CHF, Sites Jr JW. 2004. Phylogenetic relationships of lizards of the *Liolaemus petrophilus* group (Squamata, Liolaemidae), with description of two new species from western Argentina. *Herpetologica* 60: 187–203.
- Avila LJ, Morando M, Sites Jr JW. 2006. Inferring evolutionary processes in “inertial species” – an example in Patagonian lizards of the *Liolaemus fitzingerii* complex (Squamata: Liolaemidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 241–275.

- Avila LJ, Morando M, Sites Jr JW. 2008. New Species of the Iguanian Lizard Genus *Liolaemus* (Squamata, Iguania, Liolaemini) from Central Patagonia, Argentina. *Journal of Herpetology* 42: 186–196.
- Avila LJ, Morando M, Perez DR, Sites Jr JW. 2009. 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* 2234: 39–55.
- Avila LJ, Perez CHF, Morando M, Sites Jr JW. 2010a. A new species of *Liolaemus* (Reptilia: Squamata) from southwestern Rio Negro province, northern Patagonia, Argentina. *Zootaxa* 2434: 47–59.
- Avila LJ, Perez DR, Morando M, Sites Jr JW. 2010b. A new species of the *Liolaemus elongatus* clade (Reptilia: Iguania: Liolaemini) from Cordillera del Viento, northwestern Patagonia, Neuquén, Argentina. *Zootaxa* 2667: 28–42.
- Avise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. London: Harvard University Press.
- Avise JC, Wollenberg K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7748–7755.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bell T. 1843. *The zoology of the Voyage of H.M.S. Beagle, under command of Captain Fitzroy, R.N., during the years 1832 to 1836. Part V. Reptiles*. London: Smith, Elder and Co.
- Bermingham P, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-370.
- Bonvicino CR, Moreira MAM. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome *b* DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 282-292.

- Boulenger GA. 1885. *Catalogue of the lizards in the British Museum (Natural History)*. London: Taylor and Francis.
- Brehm A, Jesus J, Pinheiro M, Harris DJ. 2001. Relationships of Scincid Lizards (*Mabuya* spp; Reptilia: Scincidae) from the Cape Verde Islands Based on Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 311-316.
- Brehm A, Jesus J, Spínola H, Alves C, Vicente L, Harris DJ. 2003. Phylogeography of the Madeiran endemic lizard *Lacerta dugesii* inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 222-230.
- Breitman MF, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M. 2011. Lizards from the end of the world: phylogenetic relationships of the *Liolaemus lineomaculatus* section (Squamata: Iguania: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 364–376.
- Breitman MF, Morando M, Avila LJ. 2013. Past and present taxonomy of the *Liolaemus lineomaculatus* section (Liolaemidae): is the morphological arrangement hypothesis valid? *Zoological Journal of the Linnean Society* 168: 612–668.
- Brown WM. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: Intyre RJM, ed. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum, 95-130.
- Brown WM, Wright JM. 1975. Mitochondrial DNA and the origin of parthenogenesis in whiptail lizards (*Cnemidophorus*). *Herpetological review* 6: 70-71.
- Brown WM, George MJR, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 1967-1971.
- Bujes C, Verrastro L. 1998. Comportamento de *Liolaemus occipitalis* em cativeiro (Sauria:Tropiduridae). *Revista Brasileira de Zoologia* 15: 915-920.
- Bujes C, Verrastro L. 2006. Thermal biology of *Liolaemus occipitalis* (Squamata, Tropiduridae) in the coastal sand dunes of Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 66: 945-954.
- Bujes C, Verrastro L. 2008. Microhabitat Use by the Saxicolous Lizard, *Liolaemus occipitalis* (Squamata, Tropiduridae), in the Coastal Sand Dunes of Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia, Série Zoológica* 98: 156-160.

- Cabrera M, Bee de Speroni NT. 1986. Composición y distribución de la lacertofauna de la provincia de Córdoba, Argentina. II. Amphisbaenidae, Anguidae e Iguanidae. *Historia Natural* 6: 1-12.
- Cavallotto JL, Violante RA, Parker G. 2004. Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina). *Quaternary International* 114: 155–165.
- Cei JM. 1979. Nota preliminar sobre la distribución geográfica de *Liolaemus wiegmanni* (Duméril et Bibron) (Sauria, Iguanidae). *Publicaciones Ocasionales del Instituto de Biología Animal, Universidad Nacional de Cuyo, Serie Científica* 14: 1-4.
- Cei JM. 1986. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. *Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, Monografie* 4: 1-527.
- CLAES (Centro Latinoamericano de Ecología Social), PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente). 2008. *Geo Uruguay: Informe del estado del ambiente*. Montevideo: Gráfica Mosca.
- Clark AM, Bowen BW, Branch LC. 1999. Effects of natural habitat fragmentation on an endemic scrub lizard (*Sceloporus woodi*): an historical perspective based on a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology* 8: 1093-1104.
- Corander J, Sirén J, Arjas E. 2008. Bayesian Spatial Modelling of Genetic Population Structure. *Computational Statistics* 23: 111-129.
- Corrêa ICS, Aliotta S, Weschenfelder J. 2004. Estrutura e Evolução dos Cordões Arenosos Pleistocênicos no Canal de Acesso à Laguna dos Patos-RS, Brasil. *Revista Pesquisas em Geociências* 31: 69-78.
- Da Silva MN, Patton JL. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 7: 475-486.
- Dillenburg SR, Roy PS, Cowell PJ, Tomazelli LJ. 2000. Influence of antecedent topography on coastal evolution as tested by the Shoreface Translation-Barrier Model (STM). *Journal of Coastal Research* 16: 71-81.

- Dillenburg SR, Tomazelli LJ, Martins LR, Barboza EG. 2005. Modificações de Longo Período da linha de Costa das Barreiras Costeiras do Rio Grande do Sul. *GRAVEL* 3: 9-14.
- Dillenburg SR, Hesp PA. 2009. *Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Donoso-Barros R. 1966. *Reptiles del Chile*. Santiago: Universidad de Chile.
- Donoso-Barros R. 1970. Catálogo Herpetológico Chileno. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural* 31: 49-124.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185-1192.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Duellman W. 1979. The South American herpetofauna: a panoramic view. In: Duellman WE, ed. *The South American Herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal. Monograph of the Museum of Natural History*. Kansas: The University of Kansas, 1-28.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2471-2581.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Edwards SV, Bensch S. 2009. Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Ecology* 18: 2930-2933.
- Ely I, Verrastro L. 2004. Dieta e estratégia alimentar de *Liolaemus occipitalis* (Iguania-Tropiduridae) nas dunas costeiras do Rio Grande do Sul. In: *Livro de Resumos do Congresso Brasileiro de Zoologia*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 404.
- Esteves LS, Toldo Jr. EE, Dillenburg SR, Tomazelli LJ. 2002. Long- and Short-Term Coastal Erosion in Southern Brazil. *Journal of Coastal Research* 36: 273-282.

- Etheridge R. 1995. Redescription of *Ctenoblepharys adspersa* Tschudi, 1845, and the taxonomy of Liolaeminae (Reptilia: Squamata: Tropicuridae). *American Museum Novitates* 3142: 1-34.
- Etheridge R. 2000. A review of lizards of the *Liolaemus wiegmannii* group (Squamata, Iguania, Tropicuridae), and a history of morphological change in the sand-dwelling species. *Herpetological Monographs* 14: 293-352.
- Etheridge R, Espinoza RE. 2000. Taxonomy of the Liolaeminae (Squamata: Iguania: Tropicuridae) and a semi-annotated bibliography. *Smithsonian Herpetological Information Service* 126: 1-64.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, Freitas TRO. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88: 935-945.
- Ferreri M, Qu W, Han B. 2011. Phylogenetic networks: A tool to display character conflict and demographic history. *African Journal of Biotechnology* 10: 12799-12803.
- Fontana CS, Bencke GA, Reis RE. 2003. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Fontanella FM, Feltrin N, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M. 2012. Early stages of divergence: phylogeography, climate modeling, and morphological differentiation in the South American lizard *Liolaemus petrophilus* (Squamata: Liolaemidae). *Ecology and Evolution* 2: 792-808.
- Frost DR, Etheridge R, Janies D, Titus TA. 2001. Total Evidence, Sequence Alignment, Evolution of Polychrotid Lizards, and a Reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum Novitates* 3343: 1-38.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- Fu J. 2000. Toward the phylogeny of the family Lacertidae - Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 203–217.
- Gaggiotti OE. 1996. Population Genetic Models of Source-Sink Metapopulations. *Theoretical Population Biology* 50: 178-208.
- Gaines MS, Diffendorfer JE, Tamarin RH, Whittam TS. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88: 294-304.
- Gallardo JM. 1966. *Liolaemus lentus* nov. sp. (Iguanidae) de la Pampa y algunas observaciones sobre los saurios de dicha Provincia Argentina y del oeste de Buenos Aires. *Neotrópica* 12: 15-29.
- Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW. 2004. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19: 238-244.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774–786.
- Gruber NLS, Strohaecker TM, Ayup-Zouain RN, Farina F. 2010. Subsídios à gestão costeira: vulnerabilidades ambientais e aspectos legais para normativas de uso e ocupação. In: López RA, Marcomini SC, org. *Problemática de los Ambientes Costeros: Sur de Brasil, Uruguay y Argentina*. Buenos Aires: Editorial Croquis, 75-91.
- Gudynas E. 1981a. Consideraciones sobre la Herpetofauna del Uruguay y áreas vecinas con una aproximación biogeográfica. In: *Jornadas de Ciencias Naturales, Centro Educativo Don Orione, Montevideo* 2: 5-6.
- Gudynas E. 1981b. Comentarios sobre biotopos, habitats, herpetofauna y la biogeografía del Uruguay y áreas vecinas. In: *Jornadas de Ciencias Naturales, Centro Educativo Don Orione, Montevideo* 2: 7-8.
- Gudynas E. 1981c. New departmental records of *Liolaemus wiegmanni* from Uruguay. *Herpetological Review* 12: 84.

- Gudynas E, Rudolf JC. 1987. La herpetofauna de la localidad costera de "Pajas Blancas" (Uruguay): Lista sistemática comentada y estructura ecológica de la comunidad. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul* 46: 173-194.
- Halloy M, Etheridge R, Burghardt GM. 1998. To bury in sand: phylogenetic relationships among lizard species of the boulengeri group, *Liolaemus* (Reptilia: Squamata: Tropiduridae), based on behavioral characters. *Herpetological Monographs* 12: 1–37.
- Harris DJ, Arnold EN, Thomas RH. 1998. Rapid Speciation, Morphological Evolution, and Adaptation to Extreme Environments in South African Sand Lizards (*Meroles*) as Revealed by Mitochondrial Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 37-48.
- Hebert PDN, Cywiska A, Ball SL, deWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: S96-S99.
- Hickson RE, Slack KE, Lockhart P. 2000. Phylogeny recapitulates geography, or why New Zealand has so many species of skinks. *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 415–433.
- Honda M, Ota H, Kobayashi M, Nabhitabhata J, Yong HS, Hikida T. 2000. Phylogenetic Relationships, Character Evolution, and Biogeography of the Subfamily Lygosominae (Reptilia: Scincidae) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 452–461.
- Horn Filho NO. 2003. Setorização da Província Costeira de Santa Catarina em base aos aspectos geológicos, geomorfológicos e geográficos. *Geosul* 18: 71-98.
- Hower LM, Hedges SB. 2003. Molecular Phylogeny and Biogeography of West Indian Teiid Lizards of the Genus *Ameiva*. *Caribbean Journal of Science* 39: 298-306.

- IBAMA. 2003. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Available in the World Wide Web at: <http://www.ibama.gov.br/fauna.html> [29/05/2008].
- Isla FI, Gaido ES. 2001. Evolución geológica de la laguna Mar Chiquita. In: Iribarne O, ed. *Reserva de Biosfera Mar Chiquita: características físicas, biológicas y ecológicas*. Mar del Plata: Martín, 19-30.
- IUCN. 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Available in the World Wide Web at: <http://www.iucnredlist.org> [19/04/2013].
- Jesus J, Harris DJ, Brehm A. 2005. Phylogeography of *Mabuya maculilabris* (Reptilia) from São Tomé Island (Gulf of Guinea) inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 503-510.
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ. 2006. The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science* 311: 73-77.
- Kacoliris F, Horlent N, Williams J. 2006. Herpetofauna, Coastal Dunes, Buenos Aires Province, Argentina. *Check List* 2: 3.
- Keller C, Krause L. 1986. The appendicular skeleton of *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Sauria, Iguanidae). *Revista Brasileira de Biologia* 46: 727-740.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6196-6200.
- Laurent RF. 1983. Contribución al conocimiento de la estructura taxonómica del género *Liolaemus* Wiegmann (Iguanidae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina* 1: 15-18.
- Laurent RF. 1984. On some iguanid genera related to or previously confused with *Liolaemus* Wiegmann. *Journal of Herpetology* 18: 357-373.
- Laurent RF, Teran E. 1981. *Lista de los anfibios y reptiles de la provincia de Tucumán*. Tucumán: Ministerio de Cultura y Educación, Fundación Miguel Lillo.

- Lema T de. 1994. 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* 7: 41-150.
- Li W-H, Graur D. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- López RA, Marcomini SC. 2010. Problemática costera de Buenos Aires. In: López RA, Marcomini SC, org. *Problemática de los Ambientes Costeros: Sur de Brasil, Uruguay y Argentina*. Buenos Aires: Editorial Croquis, 107-125.
- Macey JR, Larson A, Ananjeva NB, Papenfuss TJ. 1997. Evolutionary Shifts in Three Major Structural Features of the Mitochondrial Genome Among Iguanian Lizards. *Journal of Molecular Evolution* 44: 660-674.
- Macey JR, Schulte II JA, Larson A. 2000. Evolution and Phylogenetic Information Content of Mitochondrial Genomic Structural Features Illustrated with Acrodont Lizards. *Systematic Biology* 49: 257-277.
- Mäder M. 2008. Filogeografía e Variabilidade Genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae). Unpublished Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Marcomini SC, López RA. 2010. La problemática ambiental del estuario del Río de Plata y delta del Paraná. In: López RA, Marcomini SC, org. *Problemática de los Ambientes Costeros: Sur de Brasil, Uruguay y Argentina*. Buenos Aires: Editoria Croquis, 127-141.
- Marcomini S, López R, Picca P, Madanes N, Bertolín L. 2010. Cambios en la vegetacion en costas de dunas y su influencia en el balance sedimentario. In: López RA, Marcomini SC, org. *Problemática de los Ambientes Costeros: Sur de Brasil, Uruguay y Argentina*. Buenos Aires: Editorial Croquis, 191-203.

- Mausfeld P, Vences M, Schmitz A, Veith M. 2002. First Data on the Molecular Phylogeography of Scincid Lizards of the Genus *Mabuya*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 11–14.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Mefee GK, Carrol CR. 1997. Genetics: Conservation of Diversity Within Species. In: Mefee GK, Carrol CR, contr. *Principles of Conservation Biology*. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2nd edition, 161.
- Melamed GB, Verrastro L. 1997. Estudo para a conservação de *Liolaemus* (Sauria-Tropiduridae) nas dunas e restingas do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congreso Iberoamericano de Biodiversidad y Zoología de Vertebrados. Concepción: Universidad de Concepción, 93.
- Miller MP. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Morando M, Avila LJ, Sites Jr JW. 2003. Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean–Patagonian South America. *Systematic Biology* 52: 159–185.
- Morando M, Avila LJ, Baker J, Sites Jr JW. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution* 58: 842–861.
- Morando M, Avila LJ, Turner CR, Sites Jr JW. 2007. 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* 43: 952–973.
- Morando M, Avila LJ, Turner C, Sites Jr JW. 2008. Phylogeography between valleys and mountains: the history of populations of *Liolaemus koslowskyi* (Squamata, Liolaemini). *Zoologica Scripta* 37: 603–618.

- Morando M, Avila LJ, Perez CH, Hawkins MA, Sites Jr. JW. 2013. 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* 66: 694-714.
- Moritz C, Faith DP. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.
- Olave M, Martinez LE, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M. 2011. Evidence of hybridization in the Argentinean lizards *Liolaemus gracilis* and *Liolaemus bibronii* (Iguania: Liolaemini): An integrative approach based on genes and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 381-391.
- OPP-BID (Oficina de Planeamiento y Presupuesto de Presidência de la República; Banco Interamericano de Desarrollo). 1992. Estudio ambiental nacional de la República Oriental del Uruguay 1990-91, 343 pp.
- Palumbi SR. 1996. Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds. *Molecular systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, 205-247.
- Panario D, Gutiérrez O. 2005. La vegetación en la evolución de playas arenosas. El caso de la costa uruguaya. *Ecosistemas* 14: 150-161.
- Passoni JC, Benozzati ML, Rodrigues MT. 2000. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of the three species of *Tropidurus* of the *nanuzae* group (Squamata, Tropiduridae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 351-356.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite NA, Morando M, Yassuda YY, Sites Jr JW. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.
- Peters JA, Donoso-Barros R. 1970. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part II: Lizards and Amphisbaenians. *United States National Museum Bulletin* 297: 1-293.
- Peters JA, Orejas-Miranda B, Vanzolini PE. 1986. *Catalogue of the Neotropical Squamata (Revised Edition). Part II - Lizards and Amphisbaenians*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press.

- Pincheira-Donoso D, Sclaro JA, Sura P. 2008. A monographic catalogue on the systematics and phylogeny of the South American iguanian lizard family Liolaemidae (Squamata, Iguania). *Zootaxa* 1800: 1-85.
- Posada D, Crandall KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16: 37-45.
- Radtkey RR, Fallon SM, Case TJ. 1997. Character displacement in some *Cnemidophorus* lizards revisited: A phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 94: 9740-9745.
- Rambaut, A. 2009. Tree Figure Drawing Tool. Available in the World Wide Web at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [23/09/2011].
- Rocha CFD. 1985. Ecologia de *Liolaemus lutzae* (Sauria-Iguanidae) na Restinga da Barra de Maricá-RJ. Unpublished Monograph, Universidade Estadual do Rio de Janeiro.
- Rocha CFD, Vrcibradic D, de Araújo AFB. 2000. Ecofisiologia de répteis de restingas brasileiras. In: Esteves FA, de Lacerda LD, eds. *Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras*. Macaé: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 117-149.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Saraste M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics* 23: 331-366.
- Schulte II JA, Macey JR, Larson A, Papenfuss TJ. 1998. Molecular Tests of Phylogenetic Taxonomies: A General Procedure and Example Using Four Subfamilies of the Lizard Family Iguanidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 367-376.
- Schulte II JA, Macey JR, Espinoza R, Larson A. 2000. 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* 65: 79-102.

- Schulte II JA, Valladares JP, Larson A. 2003. Phylogenetic relationships within Iguanidae using molecular and morphological data and a phylogenetic taxonomy of iguanian lizards. *Herpetologica* 59: 399-419.
- Schwarz GE. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6: 461-464.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Smith KL, Harmon LJ, Shoo LP, Melville, J. 2011. Evidence of constrained phenotypic evolution in a cryptic species complex of agamid lizards. *Evolution* 65: 976-992.
- Solé-Cava AM. 2004. Biodiversidade Molecular e Genética da Conservação. In: *Biologia Molecular e Evolução*. Matioli SR, ed. Ribeirão Preto: Editora Holos, 172-192.
- Souza ACB. 2008. Filogeografia em lagartos (Reptilia: Squamata) no baixo Tocantins, Ilha do Marajó e sul do Amapá, Brasil. Unpublished Dissertation, Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará.
- Stamatakis S. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Surget-Groba Y, Heulin B, Guillaume CP, Thorpe RS, Kupriyanova L, Vogrin N, Maslak R, Mazzotti S, Venczel M, Ghira I, Odierna G, Leontyeva O, Monney JC, Smith N. 2001. Intraspecific Phylogeography of *Lacerta vivipara* and the Evolution of Viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 449-459.
- Tajima F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor BL, Dizon AE. 1999. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology* 8: S11-S16.
- Toews DPL, Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21: 3907-3930.

- Tomazelli LJ, Dillenburg SR, Villwock JA. 2000. Late Quaternary Geological History of Rio Grande do Sul Coastal Plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* 30: 474-476.
- Tomazelli LJ, Villwock JA. 2000. O Cenozóico no Rio Grande do Sul: geologia da Planície Costeira. In: Holz M, de Ros LF, eds. *Geologia do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: CIGO UFRGS, 375-406.
- Tomazelli LJ, Villwock JA. 2005. Mapeamento geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do RS. *GRAVEL* 3: 109-115.
- Torres-Pérez F, Lamborot M, Boric-Bargetto D, Hernández CE, Ortiz JC, Palma RE. 2007. 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* 45: 72-81.
- Trimble M, Rios M, Passadore C, Szephegyi M, Nin M, Olaso FG, Fagúndez C, Laporta P. 2010. *Ecosistemas costeros uruguayos: una guía para su conocimiento*. Averaves, Cetáceos Uruguay, Karumbé. Montevideo: Editorial Imprenta Monteverde.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C. 2012. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology, Invited Review and Meta-Analyses* 1-21.
- Urien CM, Martins LR, Martins IR. 1980. Evolução Geológica do Quaternário do Litoral Atlântico Uruguaio, Plataforma Continental e Regiões vizinhas. *Notas Técnicas CECO/IG/UFRGS* 3: 7-43.
- Vanzolini PE, Ab'saber AN. 1968. Divergence rate in South American lizard of the genus *Liolaemus* (Sauria-Iguanidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 21: 205-208.
- Vega LE, Bellagamba PJ, Fitzgerald LA. 2000. Long-term effects of anthropogenic habitat disturbance on a lizard assemblage inhabiting coastal dunes in Argentina. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1653-1660.
- Verrastro L. 1991. Aspectos ecológicos e biológicos de uma população de *Liolaemus occipitalis* Boul. 1885, nas dunas costeiras da praia Jardim Atlântico, Tramandaí, RS.

- (Reptilia - Iguanidae). Unpublished Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Verrastro L. 2004. Sexual dimorphism in *Liolaemus occipitalis* (Iguania, Tropicuridae). *Iheringia, Série Zoológica* 94: 45-48.
- Verrastro L, Krause L. 1994. Analysis of growth in a population of *Liolaemus occipitalis* Boul.1885, from the coastal sand-dunes of Tramandaí, RS, Brazil. (Reptilia-Tropicuridae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 29: 99-111.
- Verrastro L, Bujes C. 1998. Ritmo de atividade de *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Sauria, Tropicuridae) na praia de Quintão, RS - Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 15: 907-914.
- Verrastro L, Krause L. 1999. Ciclo reprodutor de machos em *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885. (Sauria-Tropicuridae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 227-231.
- Verrastro L, Veronese L, Bujes C, Dias Filho MM. 2003. A new species of *Liolaemus* from southern Brazil (Iguania: Tropicuridae). *Herpetologica* 59: 105-118.
- Verrastro L, Schossler M, Silva CM. 2006. *Liolaemus occipitalis*. *Herpetological Review* 37: 495.
- Vicario S, Caccone A, Gauthier J. 2003. Xantusiid "night" lizards: a puzzling phylogenetic problem revisited using likelihood-based Bayesian methods on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 243-261.
- Victoriano PF, Ortiz JC, Benavides E, Adams BJ, Sites Jr JW. 2008. Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropicuridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology* 17: 2397-2416.
- Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9350-9354.
- Villwock JA, Tomazelli LJ. 1995. Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1-45.

- Vinciprova G, Verrastro L. 2001. O status de conservação da herpetofauna do RS: restingas litorâneas. In: Livro de Resumos do V Congresso de Ecologia do Brasil. Porto Alegre, 348.
- Weschenfelder J. 2005. Processos sedimentares e variação do nível do mar na região costeira do Rio Grande do Sul. Unpublished D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS, Aliotta S. 2005. Elementos arquiteturais do substrato da Lagoa dos Patos revelados por sísmica de alta resolução. *Pesquisas em Geociências* 32: 57-67.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS, Toldo Jr EE, Baitelli R. 2008a. Paleocanais como indicativo de eventos regressivos Quaternários do nível do mar no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica* 26: 367-375.
- Weschenfelder J, Medeanic S, Corrêa ICS, Aliotta S. 2008b. Holocene Paleoinlet of the Bojuru Region, Lagoa dos Patos, Southern Brazil. *Journal of Coastal Research* 24: 99-109.
- Zardoya R, Meyer A. 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 13: 933-942.

Author Guidelines: Zoological Journal of the Linnean Society

Instructions for Authors

The Linnean Society publishes four periodicals: the *Biological*, *Botanical* and *Zoological Journals*, and *The Linnean*, the Society's newsletter and proceedings.

The *Zoological Journal* publishes papers on systematic and evolutionary zoology and comparative, functional and other studies where relevant to these areas. Studies of extinct as well as living animals are included.

Submissions to the *Zoological Journal* are now made on-line using ScholarOne Manuscripts. This includes any revised versions of previously submitted papers. To submit to the journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/zoj>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision.

Conflict of Interest

The *Zoological Journal of the Linnean Society* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in a cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgement section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships. Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

Copyright Transfer Agreement Form

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement Form (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the Copyright Transfer Agreement Form is a condition of publication and papers will not be put into production until a signed form has been received. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). A copy of the form may be downloaded [here](#).

OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Wiley-Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Wiley Online Library. Each Online Open article will be subject to a one-off fee of US\$3000 to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge.

For the full list of terms and conditions, see: http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp (Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Author material archive policy

All original hardcopy artwork for the three Linnean Society Journals will be returned to authors after publication. Please note that, unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all electronic material and remaining hardcopy two months after publication. If you require the return of any of this material, you must inform the editorial office upon submission.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs.

Manuscript preparation

Authors should aim to communicate ideas and information clearly and concisely, in language suitable for the moderate specialist. Papers in languages other than English are not accepted unless invited. When a paper has joint authorship, one author must accept responsibility for all correspondence; the full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author who is to check proofs should be provided. Please submit your manuscript in an editable format such as .doc or .rtf. If you submit your manuscript in a non-editable format such as PDF, this will slow the progress of your paper as we will have to contact you to request an editable copy.

Papers should conform to the following general layout:

Title page

This should be uploaded as a separate file, designation 'Title Page'. It should include title, authors, institutions and a short running title. The title should be concise but informative, and where appropriate should include mention of family or higher taxon in

the form: 'The Evolution of the Brown Rat, *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae)'. A subtitle may be included, but papers in numbered series are not accepted. Names of new taxa should not be given in titles.

Abstract

This must be on a separate page. The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere, and is all that many may see of your work. It should be about 100-200 words long and should summarize the paper in a form that is intelligible in conjunction with the title. It should not include references. The abstract should be followed by up to ten keywords additional to those in the title (alphabetically arranged and separated by hyphens) identifying the subject matter for retrieval systems.

Subject matter

The paper should be divided into sections under short headings. Except in systematic hierarchies, the hierarchy of headings should not exceed three. The Zoological Codes must be strictly followed. Names of genera and species should be printed in italic or underlined to indicate italic; do not underline suprageneric taxon names. Cite the author of species on first mention. Use SI units, and the appropriate symbols (mm, not millimetre; μm , not micron., s, not sec; Myr for million years). Use the negative index (m-1, l-1, h-1) except in cases such as 'per plant'). Avoid elaborate tables of original or derived data, long lists of species, etc.; if such data are absolutely essential, consider including them as appendices or as online-only supplementary material. Avoid footnotes, and keep cross references by page to an absolute minimum. Please provide a full English translation (in square brackets) for any quoted matter that is not in English.

References

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:
<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

In the text, give references in the following forms: 'Stork (1988) said', 'Stork (1988: 331)' where it is desired to refer to a specific page, and '(Rapport, 1983)' where giving reference simply as authority for a statement. Note that names of joint authors are connected by '&' in the text. When papers are by three authors, use all names on the first mention and thereafter abbreviate to the first name *et al.* For papers by four or more authors, use *et al.* throughout.

The list of references must include all publications cited in the text and only these. Prior to submission, make certain that all references in the text agree with those in the references section, and that spelling is consistent throughout. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. For books, give the title, place of publication, name of publisher (if after 1930), and indication of edition if not the first. In papers with half-tones, plate or figure citations are required only if they fall outside the pagination of the reference cited. References should conform as exactly as possible to one of these four styles, according to the type of publication cited.

Burr FA, Evert RF. 1982. A cytochemical study of the wound-healing proteins in *Bryopsis hypnoides*. *Cytobios* 6: 199-215.

Gould SJ. 1989. *Wonderful life: the Burgess Shale and the nature of history*. New York: W.W. Norton.

Dow MM, Cheverud JM, Rhoads J, Friedlaender J. 1987b. Statistical comparison of biological and cultural/history variation. In: Friedlaender J, Howells WW, Rhoads J, eds. *Solomon Islands project: health, human biology, and cultural change*. New York: Oxford University Press, 265-281.

Gay HJ. 1990. The ant association and structural rhizome modifications of the far eastern fern genus *Lecanopteris* (Polypodiaceae). Unpublished D. Phil. Thesis, Oxford University.

Other citations such as papers 'in press' [i.e. formally accepted for publication] may appear on the list but not papers 'submitted' or 'in preparation'. These should be cited as 'unpubl. data' in the text with the names and initials of all collaborators. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list. Please give all surnames and initials for unpublished data or personal communication citations given in the text.

In the case of taxonomic reviews, authors are requested to include full references for taxonomic authorities.

Give foreign language references in ordinary English alphabetic form (but copy accents in French, German, Spanish, etc.), if necessary transliterating in accordance with a recognized scheme. For the Cyrillic alphabet use British Standard BS 2979 (1958). If only a published translation has been consulted, cite the translation, not the original. Add translations not supplied by the author of the reference in square brackets.

Tables

Keep these as simple as possible, with few horizontal and, preferably, no vertical rules. When assembling complex tables and data matrices, bear the dimensions of the printed page (225 × 168 mm) in mind; reducing typesize to accommodate a multiplicity of columns will affect legibility.

Illustrations

These normally include (1) half-tones reproduced from photographs, (2) black and white figures reproduced from drawings and (3) diagrams. Use one consecutive set of Arabic numbers for all illustrations (do not separate 'Plates' and 'Text-figures' - treat all as 'Figures'). Figures should be numbered in the order in which they are cited in the text. Use upper case letters for subdivisions (e.g. Figure 1A-D) of figures; all other lettering should be lower case.

1. Half-tones reproduced from photographs

Increasingly, authors' original images are captured digitally rather than by conventional film photography. In these cases, please use settings on your equipment for the highest possible image quality (minimum 300dpi).

Desktop technology now allows authors to prepare plates by scanning photographic originals and then labelling them using graphics programs such as Adobe Illustrator. These are acceptable provided:

2. Resolution is a minimum of 300 dpi at the final required image size. The labelling and any line drawings in a composite figure should be added in vector format. If any labelling or line drawings are embedded in the file then the resolution must be a minimum of 800 dpi. Please note that vector format labelling will give the best results for the online version of your paper.

3. Electronic files are saved uncompressed as TIFF or EPS files.

In the case that it is not possible to provide electronic versions, please supply photographic prints with labelling applied to a transparent overlay or to a photocopy.

Grouping and mounting: when grouping photographs, aim to make the dimensions of the group (including guttering of 2 mm between each picture) as close as possible to the page dimensions of 168 × 225 mm, thereby optimizing use of the available space. Remember that grouping photographs of varied contrast can result in poor reproduction. If supplied as photographic prints, the group should be mounted on thin card. Take care to keep the surface of the prints clean and free of adhesive. Always provide overlays to protect the photographs from damage.

Lettering and numbering: If supplied as photographic prints, letters and numbers should be applied in the form of dry-transfer ('Letraset') letters, numbers, arrows and scale bars, but not measurements (values), to transparent overlays in the required positions, rather than to the photographs themselves; this helps to avoid making pressure marks on the delicate surface of the prints, and facilitates relabelling, should this be required. Alternatively, pencilled instructions can be indicated on duplicates or photocopies marked 'FOR LABELLING ONLY'. Self-adhesive labels should be avoided, but if they are used, they should not be attached directly to either photographs or overlays, but to photocopies, to indicate where they are to be positioned. Labelling will be inserted electronically by the typesetter in due course.

Colour: Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt for paid full colour (see the Colour Work Agreement Form [here](#))*, covering the full cost of reproduction, such that colour is used both in the hardcopy and online. In this case, legends may make reference to colour if necessary, such as for a key. If your paper is accepted and you have opted for paid full colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. Colour illustrations will be published free of charge provided that the colour is deemed essential by the Editor for interpretation of the figure. *Please note that we are no longer able to accept electronic or scanned copies of Colour Work Agreement Forms. Please print out the form and return a signed hard copy to the production editor at the following address: Production Editor - *Zoological Journal of the Linnean Society*, Journals Content Management, Life Sciences, Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK

Black and white figures reproduced from drawings

These should be scanned at a minimum resolution of 800 dpi and supplied in TIFF format. Please note that JPEG, Powerpoint and doc files are not suitable for publication. If it is not possible to provide electronic versions, the figures supplied should be in black ink on white card or paper. Lines must be clean and heavy enough to stand reduction; drawings should be no more than twice page size. The maximum dimensions of published figures are 168 × 225 mm. Scale bars are the most satisfactory way of indicating magnification. Take account of proposed reduction when lettering drawings; if you cannot provide competent lettering, it may be pencilled in on a photocopy.

Diagrams

In most instances the author's electronic versions of diagrams are used and may be re-labelled to conform to journal style. These should be supplied as vector format Encapsulated PostScript (EPS) files. Please note that diagrams or graphs will not reproduce well in the online version of your paper unless they are in vector format due to low maximum screen resolution.

Type legends for Figures in numerical order on a separate sheet. Where a 'key' is required for abbreviations used in more than one Figure, this should be included as a section of the main text.

Authors whose manuscripts contain large phylogenies, and who feel that these cannot be represented well in the standard page format, may opt to pay for fold-out pages as part of their article (see the Fold-Out Agreement Form [here](#)). Please note that fold-out pages will be included only with the Editor's agreement.

Authors wishing to use illustrations already published must obtain written permission from the copyright holder before submitting the manuscript. Authors may, in the first instance, submit good xerox or photographic copies of figures rather than the originals.

Detailed instructions on preparing illustrations in electronic form are available [here](#).

Authors may be charged for alterations at proof stage (other than printer's errors) if they are numerous.

Supporting information

Authors wishing to submit material to be hosted as online supporting information should consult the author guidelines [here](#). Authors should note that the Editor may suggest that figures, tables, and lists not deemed necessary for the understanding of the paper should be published online as supplementary material.

Please follow these guidelines carefully:

- Include all parts of the text of the paper in a single .doc or .rtf file. The ideal sequence is: (1) Header (running heads; correspondence; title; authors; addresses; abstract; additional keywords, etc.). (2) Body of article. (3) Acknowledgements. (4) References. (5) Figure Legends. (6) Tables (for each table, the legend should be placed before the body of the table). (7) Appendices.
- Include all figure legends, and tables with their legends if available.
- Do not embed figures in the text file

- Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.
- Turn the hyphenation option off.
- Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.
- Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for ß (beta).

Copyright

Authors receiving requests for permission to reproduce work published by the Linnean Society should contact Blackwell Publishing for advice.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.