



JÉSSICA FRANCINE FELAPPI

Filogeografia e conservação de *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), lagarto endêmico da Savana Uruguaia.

Dissertação 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 Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Comparada

Orientadora: Prof^a Dr^a Laura Verrastro

Co-Orientador: Prof^o Dr^o Nelson Jurandi Rosa Fagundes

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2012

Filogeografia e conservação de *Homonota uruguayensis* (Squamata,
Phyllodactylidae), lagarto endêmico da Savana Uruguaia.

JÉSSICA FRANCINE FELAPPI

Aprovada em ____ / ____ / _____

Dr. Felipe Gobbi Grazziotin

Prof. Dr. Márcio Borges Martins

Prof. Dra. Mariana Morando

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2012

Agradecimentos

Primeiro agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e pelo financiamento do Edital Universal, que tornaram esse trabalho possível.

Tenho muito que agradecer às pessoas que de alguma forma estiveram ao meu lado durante esse tempo ou que contribuíram com o mínimo que seja para esse trabalho...

Aos meus orientadores que foram fundamentais nessa caminhada:

Laura, obrigada por tudo que fizeste por mim nesses quase 6 anos de Herpeto (o tempo voa!). Pela confiança em mim e no meu trabalho, pelo aprendizado e amizade! És realmente uma mãezona pros teus orientados, e se considero a Herpeto minha segunda casa, muito disso se deve a ti!

Nelson, bendito o dia em que dei uma de cara de pau e fui te pedir ajuda! Obrigada por se arriscar em me orientar mesmo não me conhecendo, por pegar junto mesmo no trabalho, pela didática e paciência em me ensinar esse complexo mundo onde tudo era novo pra mim... aprendi muito contigo e, graças a isso, confesso que agora até me vejo quase como uma geneticista, mas ainda com alma herpetóloga!

Agradeço aos participantes da banca por aceitarem o convite e por de alguma forma contribuir com esse trabalho:

Ao Grazziotin pelo aprendizado que me proporcionou na sua disciplina e por me ajudar na escolha de primers.

Ao Márcio por contribuir com o trabalho participando das bancas durante apresentações na pós, e também fora delas, ajudando sempre que preciso.

A Mariana Morando pelas trocas de conhecimentos e pelo envio de material genético que auxiliaram muito nas análises.

Agradeço a Carolzinha, a pioneira da filogeografia do laboratório, a partir do teu trabalho que começou meu interesse por essa área! Obrigada pela parceria na bancada, seja me ensinando ou jogando conversa fora, e fora dela também, dando conselhos, dividindo dúvidas e buscando soluções.

Rê Cardoso, juntas desde a graduação, dessa vez houveram pepinos maiores, mas sempre damos conta no final né! Valeu pela parceria de sempre, por ter ouvido minhas angústias e sempre dizer que tudo vai dar certo!!

Diego, obrigada pela parte de modelagem e pela paciência na ajuda com mapas e outras coisas que eu inventava fazer de última hora!

Em especial agradeço também as pessoas que me ajudaram em campo, Saulo e Rê no campo que passamos os maiores perrengues... Fabi, Rê Perez e Gustavo pela parceria no congelante campo no Uruguai!

Raúl Maneyro por gentilmente ceder sua licença para podermos coletar no Uruguai.

Renata Fagundes por me acalmar e aconselhar nas horas em que todos os PCRs davam errado e também por comemorar junto comigo quando as coisas finalmente funcionavam.

Ao incrível pessoal da Herpeto que tornou cada dia de trabalho muito mais agradável, especialmente Ana Júlia, Carolzinha, Laurinha, Lídia, Mari, Nati, Raíssa, Rê e as que mais me aguentaram na reta final Carol Zank, Fabi e Rê Perez. Sentirei muuita falta da convivência com vocês, dos almoços no RU, dos lanchinhos com pipoca na tarde e dos programinhas fora da UFRGS. Obrigada pelas risadas, pelo apoio e ajuda sempre que precisei!

Às minhas amigas que sempre perguntavam como estava indo o trabalho, que me animaram e deram força, principalmente pra eu acabar logo e poder ver mais elas: Anna, Bibi, Carol, Clari, Naty, Thayse, Ziza... como vocês, não existe!

Ao Douglas, obrigada por existir na minha vida, sempre parceiro ao meu lado, incentivando o meu crescimento e me dando teu carinho e amor.

À minha família que mesmo não entendendo muito bem o que eu realmente fazia, sempre me apoiou e também respeitou meus tantos momentos de ausência... nem preciso dizer o quão importantes vocês são pra mim...

“Given enough time, many things that seem
unlikely can happen.”

Darwin.

Sumário

Nota à banca	8
Resumo	9
Abstract	11
Introdução geral	13
<i>Homonota</i> Gray, 1845	13
<i>Homonota uruguayensis</i> (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961)	13
Savana Uruguaia.....	14
Filogeografia e conservação	16
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17
Referências Bibliográficas	18
Tão perto, tão longe: Forte estruturação filogeográfica em <i>Homonota uruguayensis</i> (Squamata, Phyllodactylidae), uma espécie endêmica e de distribuição restrita na Savana Uruguaia	22
Resumo	23
1. Introdução	24
2. Material e Métodos	27
2.1. Coleta das amostras e extração do DNA.....	27
2.2. Análise das sequências.....	29
2.2.1. Análises filogenéticas e tempos de divergência	29
2.2.2. Estruturação filogeográfica.....	31
2.3. Análises morfológicas.....	32
3. Resultados	33
3.1. Relações evolutivas.....	34
3.2. Morfologia	38
4. Discussão	39

4.1. Estruturação filogeográfica e história demográfica	39
4.2. Biogeografia e hipóteses de colonização.....	42
4.3. Implicações para a Conservação.....	46
Agradecimentos	47
Referências	48
Tabelas	58
Figuras	61
Material Suplementar	67
Anexo 1. Modelagem de distribuição geográfica de <i>Homonota uruguayensis</i>	70
Conclusões gerais	73
Normas de formatação Molecular Phylogenetics and Evolution	74

Nota à banca

O Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal estabelece como norma, em dissertações em forma de artigo, a presença de uma introdução geral com uma revisão bibliográfica sobre o tema, e os objetivos do trabalho, assim como uma seção final com as conclusões alcançadas.

A dissertação contém um artigo o qual pretende-se submeter à revista indicada, sob as normas para publicação anexadas. A fim de facilitar a leitura, as legendas de figuras e tabelas não foram separadas em seções diferentes. Após as sugestões e correções dos membros da banca, o artigo será traduzido para a língua inglesa.

Resumo

Homonota uruguayensis é um pequeno lagarto endêmico da Savana Uruguaia, ecorregião pertencente ao Bioma Pampa. Distribuiu-se em uma área muito restrita no sudoeste do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) e noroeste do Uruguai onde ocorrem afloramentos de basalto provenientes dos derrames vulcânicos que originaram a Formação Serra Geral. Assim como ocorre com a biodiversidade da Savana Uruguaia em geral, essa espécie é ainda pouco conhecida. Essa região vem sofrendo com uma crescente descaracterização dos seus ecossistemas originais e possui uma parcela ínfima de áreas protegidas. A filogeografia é uma ferramenta que possibilita o acesso à distribuição geográfica da variabilidade genética dentro de uma espécie, auxiliando na identificação de linhagens evolutivamente independentes que mereçam maior atenção em programas de manejo e conservação. Para compreender melhor a história evolutiva dessa espécie, 106 amostras de *H. uruguayensis* provenientes de sete localidades no Rio Grande do Sul e cinco no Uruguai, e amostras de dois grupos externos (*H. borelli* e *H. fasciata*, um indivíduo cada) foram caracterizadas através do sequenciamento de genes mitocondriais (citocromo b e 12S) e nucleares (BDNF). Além disso, dezesseis variáveis morfométricas foram caracterizadas e analisadas em um subconjunto dos indivíduos coletados. Os resultados mostraram que *H. uruguayensis* possui uma marcada estruturação filogeográfica, com a formação de quatro clados de linhagens mitocondriais que diferem em até 5% entre si, e sem compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre as localidades. Embora diferentes métodos de análise tenham recuperado topologias distintas, uma comparação entre diferentes hipóteses topológicas feita através de uma análise bayesiana sugere que a população localizada mais ao norte da distribuição (Cerro do Tigre) representa a divergência mais ancestral nessa espécie. A estruturação dos haplótipos mitocondriais é coincidente com a distribuição geográfica, sugerindo um cenário de intensa filopatria com isolamento por distância. Apesar da grande variação encontrada nos genes mitocondriais, nenhuma variação foi observada no gene nuclear BDNF. As análises morfométricas corroboram os resultados genéticos

mostrando uma tendência à diferenciação morfológica entre algumas populações. Segundo as estimativas, a separação entre *H. uruguayensis* em relação a seus grupos irmão se deu na transição do Mioceno para o Plioceno e a coalescência das linhagens mitocondriais de *H. uruguayensis* está no limite do Pleistoceno, por volta de 2,5 Ma. A população de Cerro do Tigre pode estar passando por um processo de especiação e por isso deve ser priorizada em um programa de manejo e conservação da espécie.

Abstract

Homonota uruguayensis is a small gecko endemic to the Uruguayan Savanna, an ecoregion belonging to the Pampa biome. It is distributed in a narrow area, restricted to the southwest of the Rio Grande do Sul state (Brazil) and the northwest of Uruguay, where there are basalt outcrops resulting from the volcanic eruptions that originated the Serra Geral formation in Southern Brazil. As it occurs with most of the biodiversity within this region, this is still a poorly studied species. This region is undergoing a growing degradation of its autochthonous ecosystems, but only a very minor proportion of its area is under protection. Phylogeography is a tool that allows the characterization of the geographic distribution of the genetic variation within a species, which may help to identify evolutionary independent lineages that deserve higher priority status in management and conservation programs. For a better understanding of the evolutionary history of this species, 106 samples of *H. uruguayensis* individuals from seven localities in Rio Grande do Sul and five in Uruguay, and samples from two outgroup species (*H. borelli* and *H. fasciata*, one individual each), were sequenced for mitochondrial (cytochrome b and 12S) and nuclear (BDNF) genes. In addition, sixteen morphometric variables have been characterized and analyzed in a subsample of the collected individuals. Our results show that *H. uruguayensis* has a strong phylogeographic structure, with mitochondrial lineages forming four clades which differ up to 5% among them, and no haplotype sharing among localities. Even though different analytical methods recovered different topologies, a Bayesian factor comparison between them suggests that population in the northern edge of the distribution (Cerro do Tigre) represents the most ancient divergence within the species. The genetic structure of the mitochondrial haplotypes is concordant with geographic distribution suggesting a scenario of strong philopatry and isolation by distance. In spite of the wide variation shown by the mitochondrial genes, no variation was found for the nuclear BDNF gene. The morphological analyses corroborate the results from the mitochondrial markers, with some populations being distinct from the others. It was estimated that the separation between *H. uruguayensis* and its outgroups occurred between the upper

and mid-Miocene, while the coalescence of *H. uruguayensis* haplotypes was in the Pleistocene limit, around 2.5 million years ago. The population from Cerro do Tigre may be undergoing an incipient process of speciation, and should therefore receive high priority in conservation and management programs for this species.

Introdução geral

***Homonota* Gray, 1845**

O gênero *Homonota* foi recentemente classificado como pertencente à família Phyllodactylidae, um clado transatlântico e monofilético que é grupo irmão de Gekkonidae (Gamble et al., 2008). Phyllodactylidae engloba também os gêneros *Asaccus*, *Haemodracon*, *Phyllodactylus*, *Phyllopezus*, *Ptyodactylus*, *Tarentola* e *Thecadactylus*, assim como *Bogertia*, *Garthia* e *Gymnodactylus*, que não foram incluídos nas análises filogenéticas do estudo de Gamble et al. (2008), mas são preditos pelos autores como pertencentes a essa família.

Homonota é restrito à América do Sul, possuindo uma distribuição andino-patagônica, com as suas espécies ocorrendo ao redor da latitude 25°S, em ambos os lados dos Andes (Peters & Donoso-Barros, 1970). O gênero é diferenciado pela presença de dedos não dilatados, corpo moderadamente deprimido, cauda longa e poros pré-anais e femorais ausentes (Kluge, 1964). As espécies em geral são noturnas, ovíparas, insetívoras e terrestres, raramente vistas em árvores (Ceï, 1986; Cacciali et al., 2007). Existem oito espécies válidas descritas: *H. andicola* Ceï, 1978; *H. borellii* (Peracca, 1897); *H. darwini* Boulenger, 1885; *H. fasciata* (Duméril and Bibron, 1836); *H. rupicola* Cacciali et al., 2007; *H. underwoodi* Kluge, 1964; *H. uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961); e *H. whitii* Boulenger, 1885, que se distribuem por Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (Cacciali et al., 2007; Gamble et al., 2008). No Brasil o gênero está representado por duas espécies: *Homonota fasciata* e *H. uruguayensis* (Bérnils & Costa, 2011).

***Homonota uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961)**

Homonota uruguayensis é um pequeno lagarto endêmico da Savana Uruguiaia, ecorregião pertencente ao Bioma Pampa. Sua distribuição abrange o Uruguai, na região ao

norte do Rio Negro incluindo os departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Rivera e Tacuarembó (Carreira et al., 2005), e no Brasil é registrado apenas no sudoeste do Rio Grande do Sul, nos municípios de Alegrete, Quaraí, Rosário do Sul e Santana do Livramento. Esse lagarto é encontrado em ambientes bem específicos, sob pedras soltas, ou em fendas, de afloramentos rochosos de basalto e arenito (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1973). As rochas e fendas são abrigos importantes porque, além de servirem como uma barreira eficaz de proteção contra predadores, podem manter a umidade e a temperatura relativamente altas e estáveis possibilitando a incubação dos ovos (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1973). Esses microhabitats também acabam por fornecer parte da alimentação, que é composta predominantemente por artrópodes, sendo considerada uma espécie generalista devido a alto número de categorias alimentares consumidas (Nunes, 2009). As fêmeas depositam de um a dois ovos no verão, e há registros de ninhos comunitários (Achaval & Olmos, 2007). *Homonota uruguayensis* apresenta atividade diurna e noturna, mas o pico de atividade é entre o fim da tarde e início da noite (Gudynas, 1986). Fora esses dados gerais citados, muito pouco é conhecido sobre essa espécie, que, inclusive, não possui uma definição do seu status de conservação na lista da IUCN (IUCN, 2011), uma situação preocupante se tratando de um lagarto endêmico muito restrito e que habita uma região em constante descaracterização.

Savana Uruguia

O Bioma Pampa, também chamado de Campos do Rio da Plata, compreende uma área de campos subúmidos na zona temperada do leste da América do Sul meridional, localizada aproximadamente entre as latitudes 28 e 38°S. Essa região de pouco mais de 760.000 km² engloba o centro e leste da Argentina, Uruguai e sul do Brasil (Soriano et al., 1992) e é dividida nas ecorregiões Pampas e Savana Uruguia (Dinerstein et al 1995). Os Pampas ocupam principalmente o território argentino, e a Savana Uruguia ocorre no Uruguai, sul do Brasil e em parte das províncias de Corrientes e Misiones na Argentina

(Bilenca & Miñarro, 2004). Optamos por adotar o conceito de ecorregião porque essa definição considera a distribuição da fauna e flora e tem como objetivo identificar unidades para ações conservacionistas (Olson et al 2001).

A Savana Uruguaia é formada por terras baixas, com áreas de coxilha e serras, formação geológica diversificada, solos heterogêneos, topografia ondulada, clima subtropical úmido e precipitações superiores a 1000 mm (Garcia et al., 2007). Essa região sofre uma crescente descaracterização devida principalmente à expansão da produção agrícola e da silvicultura, que só entre 2002 e 2008 aumentaram sua área ocupada em 30% (dados da FEPAM-RS). As invasões biológicas de espécies como o capim-annoni (*Eragrostis plana*) também ameaçam a fauna associada a essa formação, que é o habitat de muitas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (Pillar et al., 2009). Esse cenário se torna ainda mais preocupante quando constatamos a ínfima parcela de área protegida dentro dessa ecorregião. Apenas cerca de 2% da área da Savana Uruguaia está oficialmente protegida enquanto que o mínimo deveria ser 10% em cada ecorregião (Bibby, 1998; Soutullo & Gudynas, 2006).

Além de ser uma ecorregião negligenciada na sua conservação, existem poucos estudos focados nos organismos ou na biogeografia da região. Em termos filogeográficos, alguns trabalhos foram realizados englobando o Pampa, principalmente com mamíferos autóctones como veado (González et al., 1998), tuco-tuco (Wlasiuk et al., 2003; Gonçalves & Freitas, 2009), tatu (Poljak et al., 2010), e exóticos como o javali (García et al., 2011). Além de esforços voltados para realização de inventários de áreas a fim de potencializar a possibilidade de descoberta de novas espécies, esforços voltados ao estudo da história evolutiva dos organismos dessa região podem ser de grande importância para a elaboração de planos de conservação adequados, principalmente se envolverem espécies endêmicas.

Filogeografia e conservação

Começando como uma disciplina formal em 1987 (Avice, 1987), e crescendo exponencialmente durante os anos 90, a filogeografia atualmente é considerada uma das mais importantes ferramentas para o entendimento dos componentes históricos da distribuição espacial contemporânea das linhagens de genes ao nível intra ou interespecífico (Avice, 2000). Os seus principais objetivos são decifrar os componentes temporais e espaciais da estruturação populacional, interpretar os processos evolucionários e ecológicos envolvidos (Beheregaray, 2008) e entender como os padrões de divergência se relacionam ou coincidem com fatores geográficos e geológicos atuais e históricos (Chan et al., 2011). O DNA mitocondrial, por apresentar características peculiares como a herança uniparental (materna), a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas, quando comparado ao genoma nuclear, é uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas principalmente de baixos níveis taxonômicos, como relações intragenéricas ou intraespecíficas (Bonvicino & Moreira, 2001; Calcagnotto, 2001).

Uma revisão recente sobre o *status* da Filogeografia no hemisfério sul mostrou que até o ano de 2006 apenas 6,3% dos estudos filogeográficos focaram organismos da América do Sul, e que essa, quando comparada aos outros continentes, ocupou a penúltima posição entre os continentes, à frente apenas da Antártida (Beheregaray, 2008). Trabalhos com herpetofauna ficam na quinta posição entre os grupos animais estudados (cerca de 12%), sendo a maior parte dos trabalhos realizados na América do Norte (42%) e apenas 10% na América do Sul (em quarto lugar, atrás da Europa e Austrália) (Beheregaray, 2008).

Os gecos são um bom exemplo de um grupo que apresenta convergência morfológica dentro dos répteis, com muitas espécies de morfologia e hábitos similares (Perera & Harris, 2010). Estudos filogeográficos e filogenéticos com esse grupo estão revelando espécies crípticas que não haviam sido reconhecidas por métodos baseados em morfologia, além de níveis excepcionais de variação intraespecífica no DNA mitocondrial (Harris et al., 2004; Kasapidis et al., 2005; Kronauer et al., 2005; Oliver et al., 2009; Perera &

Harris, 2010). Na América do Sul ainda são escassos os trabalhos com gecos (Kronauer et al., 2005; Pellegrino et al., 2005; Bergmann & Russel, 2007; Gamble et al., 2008b, 2012) e portanto, uma boa parte da diversidade desse grupo pode estar sendo subestimada.

Definir unidades de manejo dentro de espécies é mais difícil e controverso do que definir espécies, já que populações podem estar a caminho da especiação (Frankham et al., 2004). O acesso à distribuição geográfica da variabilidade genética dentro de cada espécie assume central importância em programas de manejo e conservação, pois permite a identificação de áreas geográficas com restrita troca de indivíduos que reflitam linhagens evolutivamente independentes, além da identificação de áreas prioritárias para o monitoramento, manejo e proteção (Avice, 1994; Moritz & Faith, 1998; Taylor & Dizon, 1999).

Objetivo geral

Com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre esta espécie e gerar informações que possam contribuir com a sua conservação, propõe-se um estudo filogeográfico do lagarto *Homonota uruguayensis*, empregando análises moleculares e morfológicas.

Objetivos específicos

- Analisar a estrutura populacional de *Homonota uruguayensis* ao longo de sua área de ocorrência.
- Analisar a variabilidade genética da espécie e de suas populações.
- Verificar uma possível diferenciação morfológica entre populações da espécie.
- Verificar a existência de unidades evolutivamente significativas e se assim, sugerir medidas de conservação para a espécie.

Referências Bibliográficas

- Achaval, F., Olmos, A. 2007. Anfíbios y Reptiles del Uruguay. Serie Fauna no 1. 3ª ed. corregida y aumentada. Zonalibro Industria Gráfica, Montevideo, Uruguay, 160p.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall. New York. 511 p.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. London, Harvard University Press, VIII+446p.
- Beheregaray, L. B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754-74.
- Bergmann, Philip J, Anthony P Russell. 2007. Systematics and biogeography of the widespread Neotropical gekkonid genus *Thecadactylus* (Squamata), with the description of a new cryptic species. *Zoological Journal of the Linnean Society*: 339-370.
- Bérnils, R. S., H. C. Costa (org.). 2011. Brazilian reptiles – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em dezembro de 2011.
- Bibby, C.J. (1998) Selecting areas for conservation. In: Conservation Science and Action (ed. W.J. Sutherland), pp. 176–201. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Bilenca, D., Miñarro, F. (Org.). 2004. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. 1 ed. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre Argentina, 352p.
- Bonvicino, C. R., Moreira, M. A. M. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2):282-292.
- Cacciali, P.; Ávila, I., Bauer, F. 2007. A new species of *Homonota* (Squamata, Gekkonidae) from Paraguay, with a key to the genus. *Phyllomedusa*, 6(2):137-146.
- Calcagnotto, D. 2001. Taxa de evolução e o relógio molecular, p. 51 – 63. In: Matioli, S. R. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, Holos Editora, 202 p.
- Carreira, S.; Meneghel, M., Achaval, F. 2005. Reptiles del Uruguay. Facultad de Ciencias, Univ. de La República, Montevideo.
- Cei, J. M. 1986. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. Museo Regionale di Scienze naturali di Torino, Monografía IV. 527 pp.

- Chan, Lauren M., Jason L. Brown, Anne D. Yoder. 2011. Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 523-537.
- Dinerstein, E., Olson D. M., Graham, D. J., Webster, A. L., Primm, S. A., Bookbinder, M. P., Ledec, G. 1995. A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean. Washington (DC): World Bank.
- FEPAM-RS, <http://www.fepam.rs.gov.br> Acesso em maio de 2011.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press, 220 pp.
- Gamble, T.; Bauer, A.M.; Greenbaum, E., Jackman, T. R. 2008a. Out of the blue: a novel, trans-Atlantic clade of geckos (Gekkota, Squamata). *Zoologica Scripta*, 37:355–366.
- Gamble, T., Simons, A. M., Colli, G. R., Laurie J Vitt. 2008b. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 269-77.
- Gamble, T., Colli, G. R., Rodrigues, M. T., Werneck, F. P., Simons, A. M. 2012. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (*Phyllopezus*; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America's open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 943-953.
- Garcia., P.C.A., Lavilla, E., Langone, J., Segalla, M.V. 2007. Anfíbios da região subtropical da América do Sul – padrões de distribuição. Em: *Ciência & Ambiente, Fauna Neotropical Austral* 35, 65-100.
- García, Graciela, Julia Vergara & Raúl Lombardi. 2011. Genetic characterization and phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced into Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 34 (2): 329-37.
- Gonçalves, G. L., Freitas, T. R. O. 2009. Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 90 (4): 1020-1031.
- González, S.; Maldonado, J E., Leonard, J. A., Vilá, C., Duarte, J. M. B., Merino, M., Brum-Zorrilla, N., Wayne, R. K. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology* 7: 47-56.
- Gudynas, E. 1986. Notes on the behavior of *Homonota uruguayensis* with special reference to elevated postures. *CIPFE CED Orione Cont. Biol.*, 14:1-10.
- Harris, D. J., Batista, V., Lymberakis, P., Carretero, M. A. 2004. Complex estimates of evolutionary relationships in *Tarentola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae) derived from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30 (3): 855-9.

- IUCN, 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 18 de Abril de 2012.
- Kasapidis, P., Magoulas, A., Mylonas, M., Zouros, E. 2005. The phylogeography of the gecko *Cyrtopodion kotschy* (Reptilia: Gekkonidae) in the Aegean archipelago. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 612-23.
- Kluge, A. G. 1964. A Revision of the South American Gekkonid Lizard Genus *Homonota* Gray. *American Museum Novitates* 2193: 1-41
- Kronauer, D. J. C., Bergmann, P. J., Mercer, J. M., Russell, A. P. 2005. A phylogeographically distinct and deep divergence in the widespread Neotropical turnip-tailed gecko, *Thecadactylus rapicauda*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 431-7.
- Moritz, C. & Faith, D. P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for consevation. *Molecular Ecology*, 7(4):419-429.
- Nunes, V. A. 2009. Dieta e estratégia alimentar de *Homonota uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Gekkota, Phyllodactylidae) nos Pampas do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 42 p. Monografia de Conclusão de Curso, Bacharelado em Ciências Biológicas.
- Oliver, P. M., Adams, M., Lee, M. S. Y., Hutchinson, M. N., Doughty, P. 2009. Cryptic diversity in vertebrates: molecular data double estimates of species diversity in a radiation of Australian lizards (*Diplodactylus*, Gekkota). *Proceedings of The Royal Society* 276: 2001-7.
- Olson, D. M.; Dinerstein, E.; Wikramanayake, E. D.; Burgess, N. D.; Powell, G.V.N.; Underwood, E. C.; D'amico, J. A.; Itoua, I; Strand, H. E.; Morrison, J. C.; Loucks, C. J.; Allnutt, T. F.; Ricketts, T. H.; Kura, Y.; Lamoreux, J. F.; Wettengel, W. W.; Hedao, P.; Kassem, K. R. 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience* 51 (11): 933-938.
- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Waite, A. N., Morando, M., Yassuda, Y. Y., Sites, J. W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.
- Perera, A. & Harris, D. J. 2010. Genetic variability within the Oudri's fan-footed gecko *Ptyodactylus oudrii* in North Africa assessed using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 634-9.
- Peters, J. A. & Donoso-Barros. 1970. Catalogue of the Neotropical Squamata, Part II: Lizards and Amphisbaenians. *Bulletin of United States National Museum*, 297:1-293.

- Pillar, V. P.; Müller, S. C.; Castilhos, Z. M. S. & Jacques, A. V. A (editores). 2009. Campos sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: MMA, 403 p.
- Poljak, S., Confalonieri, V., Fasanella, M., Gabrielli, M., Lizarralde, M. S. 2010. Phylogeography of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae Xenarthra): post-glacial range expansion from Pampas to Patagonia (Argentina). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 38-46.
- Soriano, A., León, R.J.C., Sala, O.E., Lavado, R.S., Deregibus, V.A., Cahuepé, M.A., Scaglia, O.A., Velazquez, C.A., Lemcoff, J.H. 1992. Río de la Plata grasslands. In: *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands.* (Coupland, R.T. ed.) Elsevier, New York, 367-407.
- Soutullo, A., & Gudynas, E. 2005. How effective is the MERCOSUR's network of protected areas in representing South America's ecoregions? *Oryx* 40 (1): 112-116.
- Taylor, B. L. & Dizon, A. E. 1999. First policy then science: why management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*, 8, Suppl.:S11-S16.
- Vaz-Ferreira, R. & Sierra de Soriano, B. 1973. Notas ecológicas sobre *Homonota uruguayensis*. *Bol. Soc. Zool. Uruguay*, 2:53-63.
- Wlasiuk, G., Garza, J. C., Lessa, E. P. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57 (4): 913-26.

Tão perto, tão longe: Forte estruturação filogeográfica em *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), uma espécie endêmica e de distribuição restrita na Savana Uruguaia.

Jéssica F. Felappi ^{a,1}, Nelson J.R. Fagundes ^{b,2}, Renata C. Vieira ^{a,3}, Laura V. Verrastro ^{a,4}

^a Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

^b Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

¹ Autor para correspondência: jehfelappi@gmail.com

² nrosa1977@gmail.com

³ renatacva@gmail.com

⁴ lauraver@ufrgs.br

Artigo a ser submetido na revista: Molecular Phylogenetics and Evolution

Resumo

Apesar da reconhecida megadiversidade presente na América do Sul, a quantidade de estudos moleculares baseados em organismos dessa região ainda é escassa. A situação é ainda pior quando focamos os campos temperados, onde existe uma grande lacuna de conhecimento sobre sua diversidade, aspectos genéticos e biogeográficos. *Homonota uruguayensis* é um pequeno geco endêmico dos afloramentos de basalto da Savana Uruguaia, ecorregião pertencente ao Bioma Pampa. A partir do sequenciamento dos genes mitocondriais *cytb* e 12S de 106 indivíduos dessa espécie e da análise de 16 variáveis morfométricas, foi possível inferir sobre a história evolutiva dessa espécie, incluindo aspectos demográficos e seu significado para a conservação. *Homonota uruguayensis* apresentou uma forte estruturação genética que foi associada às distâncias geográficas entre as localidades amostradas. As análises genéticas, morfológicas e os dados ecológicos disponíveis convergem para um cenário de isolamento profundo entre as diferentes populações não mais recente que cerca de 250.000 anos atrás. A espécie parece ter migrado desde o norte de sua distribuição, provavelmente através da Coxilha de Haedo, apresentando um sinal mais recente de expansão populacional em sua distribuição central. Os resultados têm fortes implicações para a conservação da espécie e podem ser úteis para a elaboração de um modelo mais geral sobre a história evolutiva de espécies pertencentes à Savana Uruguaia.

Palavras-chave: filogeografia; Pampa; lagarto; conservação; *cytb*; 12S

1. Introdução

Apesar da sua alta diversidade biológica, a América do Sul ainda é um continente relativamente pouco estudado, com diversas questões em aberto sobre aspectos taxonômicos, sistemáticos, evolutivos e, conseqüentemente, sobre padrões de distribuição da maioria dos táxons sul-americanos (Sivasundar et al., 2001; Garcia et al., 2007; Morais et al., 2007). Os trabalhos filogeográficos que focam organismos sul-americanos são escassos (cerca de 6% do total de trabalhos publicados sobre o tema), sendo esse o continente com menor número de trabalhos publicados com exceção da Antártida (Beheregaray, 2008).

O Bioma Pampa, também conhecido como Campos do Río de la Plata (Soriano et al., 1992), é uma região de alta diversidade, que abriga diversas espécies endêmicas ou restritas, e é tradicionalmente dividido nas ecorregiões do Pampa Argentino e da Savana Uruguaia (Dinerstein et al., 1995; Bilenca & Miñarro, 2004). A Savana Uruguaia inclui a metade sul do Rio Grande do Sul (Brasil), todo território do Uruguai, e parte da província argentina de Entre Rios, cobrindo uma superfície de 355.700 km² (WWF, 2001). Essa ecorregião é considerada ameaçada (WWF, 2001), e vem sofrendo com danos causados pela invasão de espécies exóticas e pela supressão de extensas áreas com ecossistemas nativos (campos, banhados e matas de galeria) para uso agropecuário, agrícola e, mais recentemente, silvícola.

De acordo com as projeções de cenários futuros propostos para diversos biomas do mundo o ecossistema de campos é um dos que passará por maiores perdas de biodiversidade no próximo século devido principalmente a fatores como o uso da terra e mudanças climáticas (Sala et al., 2000). Levando em conta que apenas cerca de 2% da área da Savana Uruguaia está oficialmente protegida, em contraste com a sugestão de um mínimo de 10% em cada ecorregião (Bibby, 1998; Soutullo & Gudynas, 2006), é necessário que trabalhos nessa região sejam incentivados para que se possa ter um melhor

conhecimento da real biodiversidade presente nessa ecorregião e como poderemos preservá-la.

Dessa forma, apesar de o Bioma Pampa ser uma das maiores regiões de campos temperados do mundo e o principal ecossistema de campos da América do Sul, com uma área de cerca de 760.000 km² (Bilenca & Miñarro, 2004), existem poucos estudos filogeográficos publicados sobre espécies dessa região (González et al., 1998; Wlasiuk et al., 2003; Fernandes et al., 2009; Poljak et al 2010; García et al., 2011). A maior parte dos estudos filogeográficos realizados com lagartos neotropicais concentram-se na região Amazônica (Kronauer et al., 2005), Andina (Torres-Pérez et al., 2007; Morando et al., 2008; Victoriano et al., 2008), Patagônica (Ávila et al., 2006; Morando et al., 2007) e Mata Atlântica (Pellegrino et al., 2005), ainda que esses animais sejam considerados organismos modelo para estudos filogeográficos (Camargo et al., 2010).

Homonota Gray, 1845 possui oito espécies restritas à América do Sul, que ocorrem ao redor da latitude 25°S, em ambos os lados dos Andes (Peters & Donoso-Barros, 1970). Recentemente esse gênero foi classificado como membro da família Phyllodactylidae, um clado monofilético de gecos do Novo Mundo com ancestrais vindos da África, sendo grupo irmão de Gekkonidae (Gamble et al., 2008a). *Homonota uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961) é um lagarto pequeno, que não ultrapassa 50 mm de comprimento rostro-cloacal, endêmico da ecorregião da Savana Uruguaia. No Uruguai, sua distribuição se restringe à região ao norte do Rio Negro (Carreira et al., 2005), e no Brasil no sudoeste do estado do Rio Grande do Sul. A espécie é encontrada em ambientes bem específicos: áreas de afloramentos rochosos não sombreados compostos de rochas de basalto e arenito soltas e sobrepostas. São ativos nos períodos diurno e noturno, e possuem reprodução anual com posturas de um a dois ovos (Achaval & Olmos, 2007). Os trabalhos publicados sobre a espécie são restritos a sua descrição (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano 1961), aspectos morfológicos (Kluge 1964), notas ecológicas (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano 1965, 1973; Gudynas & Gambarotta 1980; Gudynas 1986, Achaval & Olmos, 2007), distribuição

(Carreira et al., 2005) e a uma análise cladística de alguns membros do gênero (Abdala, 1998). No Uruguai, devido a sua distribuição mais ampla, a espécie foi considerada como não ameaçada (least concern, Canavero et al., 2010), assim como no Brasil, mesmo tendo distribuição mais restrita.

Estudos moleculares com gecos estão revelando espécies crípticas que não haviam sido reconhecidas por métodos baseados em morfologia (Harris et al., 2004; Kasapidis et al., 2005; Kronauer et al., 2005; Gamble et al., 2008, 2012; Oliver et al., 2009; Perera & Harris, 2010). Na América do Sul ainda são escassos os trabalhos com esse grupo (Kronauer et al., 2005; Pellegrino et al., 2005; Bergmann & Russel, 2007; Gamble et al., 2008b, 2012) e portanto, uma boa parte da diversidade dos gecos na região pode estar sendo subestimada. Além de auxiliarem no acesso à real diversidade existente, estudos genéticos são importantes para o acesso à história evolutiva das espécies. A partir da reconstrução do padrão evolutivo em nível intraespecífico pode se obter informações que contribuem na determinação de estratégias adequadas para a conservação, pois permitem a identificação de estruturação geográfica e subdivisões populacionais históricas e/ou atuais das espécies (Eizirik, 1996). O DNA mitocondrial, por apresentar características peculiares como a herança uniparental (materna), a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas quando comparado ao genoma nuclear, é o marcador molecular mais utilizado nos estudos das relações evolutivas em níveis taxonômicos baixos ou entre as linhagens segregantes dentro de metapopulações (Bonvicino & Moreira, 2001; Calcagnotto, 2001). Através de uma abordagem filogeográfica do lagarto *Homonota uruguayensis* esse trabalho tem como objetivos: (a) acessar a variabilidade e diferenciação genética entre populações da espécie, (b) identificar as relações filogenéticas entre essas populações, (c) checar se os resultados obtidos com as análises moleculares se refletem na análise de caracteres morfológicos, (d) sugerir prioridades de conservação para a espécie, (e) propor um cenário evolutivo para essa espécie de modo a contribuir com o conhecimento dos processos evolutivos que moldaram a diversidade genética na Savana Uruguia. É importante salientar

que o presente estudo representa o primeiro trabalho molecular realizado com o gênero *Homonota* e o primeiro sobre uma espécie de lagarto nessa ecorregião.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras e extração do DNA

Foram coletadas 106 amostras de *Homonota uruguayensis* provenientes de 12 localidades (Tabela 1; Figura 1) cobrindo a distribuição conhecida da espécie. As coletas incluíram sete locais no Rio Grande do Sul, sendo três no município de Alegrete (Cerro do Tigre, BR290 e Fazenda São Francisco), um em Rosário do Sul (Fazenda Casa Branca), um em Quaraí (Cerro do Jarau) e dois em Santana do Livramento (BR293 e Cerros Verdes). No Uruguai foram amostradas cinco populações nos departamentos de Rivera, Paysandú, Salto e em dois locais em Artigas. As distâncias geográficas entre as localidades variaram de 25 a 275km, a extensão de ocorrência e a área de ocupação (IUCN, 2010) foram estimadas a partir das localidades acima citadas acrescidas de registros da literatura (Carreira et al., 2005). As coletas foram autorizadas pelas autoridades competentes de ambos os países (Ministério do Meio Ambiente, BR - SISBIO licença número 12613-1 e Dirección de Recursos Naturales del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, UY). Os exemplares coletados no Rio Grande do Sul foram depositados na Coleção Científica do Laboratório de Herpetologia, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e os provenientes do Uruguai na Colección de Reptiles da Facultad de Ciencias, junto ao Museo Nacional de Historia Natural do Uruguai. Um indivíduo de *Homonota borellii* e um indivíduo de *H. fasciata* procedentes das províncias argentinas de Santiago del Estero e Mendoza, respectivamente, foram sequenciados e utilizados como grupos externos.

A extração de DNA foi feita a partir de amostras do fígado, músculo da cauda ou língua. Durante a coleta os tecidos foram imediatamente conservados em álcool 99% e após

transferidos para um freezer. O DNA foi extraído através de método salino adaptado de Medrano et al. (1990), com algumas modificações.

Dois fragmentos do DNA mitocondrial (citocromo b e 12S rRNA) foram amplificados em um mix de PCR com volume total de 20µl contendo 1,5mM de MgCl₂, tampão de PCR 10X, 0,2µM de dNTP's, 0,2µM de cada primer, 0,2U de Taq DNA polimerase, além de 1µl de DNA. Eventualmente, 1-2µl de Triton 4% foram adicionados ao mix para um melhor resultado do PCR. As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Para o citocromo b (*cytb*) foram amplificados 720pb através das versões modificadas dos primers 703Botp (5'TCA AAY ATC TCA ACC TGA TGA AAY TTY GG3') e MVZ16p (5'GGC AAA TAG GAA GTA TCA YTC TGG YTT3') do trabalho de Pook et al. (2000). O programa foi o mesmo utilizado por esse autor, mas com uma temperatura de anelamento de 58°C. O gene 12S rRNA (12S) teve 420pb amplificados com os primers modificados L1091 (5'AAA CTR GGA TTA GAT ACC CYA CTAT3') e H1478 (5'GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT3') de Kocher et al. (1989). As condições seguiram o programa de Carranza et al. (2000), com temperatura de anelamento de 56°C.

Realizamos uma subamostragem selecionando haplótipos que abrangiam todas as localidades coletadas (n=34) para amplificar um fragmento do gene nuclear (700pb) BDNF (brain-derived neurotrophic factor) com os primers BDNF_DRV_F1 (5'ACC ATC CTT TTC CTK ACT ATGG3') e BDNF_DRV_R1 (5'CTA TCT TCC CCT TTT AAT GGTC3') de Vieites et al. (2007). As condições do PCR foram as seguintes: pré-desnaturação a 94°C por 3 min; 40 ciclos de 94°C por 0,5 min, temperatura de anelamento por 1 min, 72°C por 1,5 min. Nos primeiros 9 ciclos a temperatura de anelamento foi de 60°C diminuindo 1°C a cada ciclo, e nos restantes foi fixada em 50°C.

Os produtos do PCR foram verificados via eletroforese em gel de agarose 1% com o DNA corado com 1µl de GelRed em 1mL de BFB 10%. Após, foram purificados enzimaticamente com exonuclease I e shrimp alkaline phosphatase (ExoSAP) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul).

2.2. Análise das sequências

Os cromatogramas foram conferidos no software Chromas v. 2.33 (<http://www.technelysium.com.au>) e as sequências editadas no MEGA 5 (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar 2011). Os alinhamentos das sequências de *cytb* e BDNF foram realizados com o algoritmo MUSCLE (parâmetros padrões) implementado no programa MEGA 5, com posterior tradução para aminoácidos para verificação de possíveis *stop codons*. O fragmento de 12S foi alinhado no programa MAFFT v. 6 (*online*) com a estratégia Q-INS-i, que considera a estrutura secundária da molécula de RNA incorporando a probabilidade do pareamento das bases no alinhamento resultante (Katoh & Toh, 2008).

A análise preliminar das sequências do gene nuclear BDNF, constatou não haver variação intraespecífica nesse fragmento, portanto ele foi retirado das análises. Como as redes de haplótipos (descritas a seguir) dos dois genes mitocondriais recuperaram as mesmas relações, as sequências desses genes foram concatenadas no programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) e esse *data set* foi utilizado em todas as análises.

2.2.1. Análises filogenéticas e tempos de divergência

No programa DAMBE 5.2.57 (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>) foi verificado o nível de saturação das sequências através do teste de saturação de substituições (Xia et al. 2003; Xia and Lemey 2009). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada gene foi calculado no MEGA 5.

Construíram-se árvores filogenéticas pelos métodos de máxima verossimilhança (maximum-likelihood ML) e de inferência Bayesiana (Bayesian inference BI) através dos programas RAxML 7.0.3 (Stamatakis, 2006) e BEAST 1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007), respectivamente, utilizando-se somente os haplótipos diferentes observados na amostra. Na ML foi adotado o modelo GTR+G+I (GTR é o único modelo de nucleotídeos suportado pelo programa) com partição dos genes, já que são duas regiões mitocondriais diferentes, e

considerando separadamente cada posição de códon do gene codificante *cytb*. Foram rodadas 100 árvores iniciais e 1000 réplicas de *bootstrap*.

Para a construção da árvore bayesiana, quatro estratégias de partição foram comparadas: GTR+G+I para os dois genes (tratados como uma única partição); modelo HKY+G+I para 12S e modelo TN93+G+I para *cytb* (os melhores modelos calculados para cada gene); mesmos modelos, mas *cytb* particionado em 2 posições de códon (1+2, 3); mesmos modelos e *cytb* particionado em 3 posições de códon. Esses modelos foram comparados através do cálculo do fator de Bayes, geralmente considerado a maneira correta de selecionar a melhor estratégia para conduzir a análise bayesiana (Drummond et al., 2006). Os testes de fator de Bayes foram realizados no programa Tracer v. 1.5 (Drummond & Rambaut, 2007) usando 5000 replicações. Cada análise foi avaliada no programa BEAST 1.6.2 utilizando 100 milhões de passos de cadeia-de-Markov-Monte-Carlo, amostrando a cada 1000 passos. O teste de fator de Bayes também foi utilizado para testar hipóteses topológicas alternativas (ver Resultados) utilizando-se os mesmos parâmetros descritos acima.

Devido à falta de fósseis apropriados e de eventos geológicos conhecidos na região que pudessem servir como pontos de calibragem da árvore filogenética, foi utilizada uma taxa de substituição retirada de um estudo com gecos do gênero *Hemidactylus* (Arnold et al., 2008), no qual foram analisados os mesmos genes mitocondriais (*cytb* e 12S). Os tempos de divergência foram estimados no programa BEAST 1.6.2 utilizando-se um relógio estrito e uma distribuição normal para a taxa de substituição com média de 1,15% por milhão de anos (Ma), e um desvio padrão de 0,2% por Ma. O programa Tracer v. 1.5 foi utilizado para checar a convergência das corridas e a adequação dos tamanhos efetivos de amostra (ESS>200).

2.2.2. Estruturação filogeográfica

As estatísticas sumárias (número de haplótipos; sítios polimórficos; diversidades haplotípicas e nucleotídicas) foram calculadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Nesse mesmo programa foi estimado o nível de estruturação genética entre as populações através do Φ_{ST} , que é uma estatística análoga à estatística-F clássica de Wright, mas que leva em conta a distância entre os alelos (haplótipos). Esse programa também foi usado para estimar a diferença média entre pares de populações usando uma distância genética simples (*uncorrected p distances*). A associação entre a distância genética e a distância geográfica foi testada através do Teste de Mantel no programa Alleles in Space 1.0 (Miller, 2005) com 1000 réplicas. A rede de haplótipos foi gerada pelo método Median-Joining (Bandelt et al., 1999) no programa NETWORK 4.6 (www.fluxus-engineering.com).

Analisamos possíveis flutuações demográficas ocorridas, como bottlenecks e expansões, através de testes de neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu), que assinalam valores significativamente negativos para esses eventos, utilizando o Arlequin 3.5. Adicionalmente, realizamos no programa BEAST 1.6.2 uma análise de Bayesian Skyline Plot (BSP), que oferece uma idéia de como o tamanho populacional mudou ao longo do tempo. Os modelos e a taxa de substituição utilizados nessa análise foram os mesmos da Inferência Bayesiana (ver tópico anterior). Finalmente, estimativas de tamanho (θ) e crescimento populacional para cada localidade separadamente foram realizadas no programa LAMARC v. 2.1.6 (Kuhner, 2006) usando a opção de análise Bayesiana para otimizar o tempo necessário para a análise. Foi realizada uma estratégia de busca que utilizou três réplicas de 20 cadeias iniciais de 20.000 gerações e duas cadeias longas finais de 20.000.000 de gerações, amostrando a cada 1.000 gerações.

2.3. Análises morfológicas

Verificamos a existência de uma possível diferenciação morfológica entre as populações da espécie através de análises morfométricas. Foram separados somente os indivíduos adultos coletados e sequenciados em cada população (machos a partir de 38,47mm e fêmeas 35,08mm; Martins, L., com. pessoal) para evitar que efeitos ontogenéticos influenciassem as análises. Setenta e nove indivíduos adultos foram dissecados para a observação do sexo, resultando em 35 machos (M) e 44 fêmeas (F).

Foram mensuradas dezesseis variáveis: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CCab), largura da cabeça (LCab), comprimento do pescoço (CPes), largura do pescoço (LPes), comprimento do focinho (CFoc), largura da base da cauda (LCau), comprimento da axila até a virilha (CAx-vir), comprimento do braço (CBr), comprimento do antebraço (CAnt-br), comprimento da tíbia (CTibia), comprimento do fêmur (CFemur), comprimento do terceiro dedo anterior (C3ant) e posterior (C3pos) e comprimento do quarto dedo anterior (C4ant) e posterior (C4pos). Utilizou-se um paquímetro digital Mitutoyo com precisão de 0,01mm.

Foi testada a dependência entre as variáveis CCab e LCab assim como, CPes e LPes através de regressões simples. Todas as medidas foram logaritmizadas e o dimorfismo sexual foi verificado através de testes-t, e Mann-Whitney quando os dados não apresentaram normalidade. Uma possível diferença de CRC entre as localidades foi testada por *One-way* ANOVA associada ao teste *post-hoc* Tukey. A fim de reduzir o efeito do tamanho corporal nas medidas foram utilizados nas análises os resíduos de regressão de cada variável em relação ao CRC. Sendo assim, a variável CRC foi descartada das análises estatísticas posteriores. Os indivíduos foram agrupados por localidade de coleta, resultando em 11 grupos. Primeiramente foi realizada uma Análise Discriminante (*forward stepwise*), que calcula uma matriz de classificação avaliando a taxa de sucesso em atribuir os indivíduos a sua correta localidade, e também indica as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos grupos. Após, uma Análise Multivariada da Variância (MANOVA) e

uma Análise de Variância Canônica (CVA) foram feitas utilizando as variáveis significativamente discriminantes indicadas pela análise anterior a fim de reconhecer diferenças significativas entre as populações. Foram utilizados os programas PAST v. 2.02 (Hammer, Harper & Ryan, 2001) e STATISTICA v. 7.1. (StatSoft, Inc. 2005).

3. Resultados

Um alinhamento total de 1088pb englobando os dois genes mitocondriais (694pb-*cytb*; 394pb-12S) foi obtido para os 106 indivíduos de *H. uruguayensis* mais os dois indivíduos usados como grupos externos. Para o gene nuclear BDNF foi obtido um alinhamento de 683pb a partir de amostras de 34 indivíduos. Porém, esse fragmento não apresentou variação intraespecífica e, portanto não foi considerado nas análises descritas a seguir. Foram identificados 50 haplótipos para *H. uruguayensis* com 127 sítios variáveis, sendo 112 desses informativos para a parcimônia. Considerando os grupos externos, foram observados 259 sítios polimórficos com 135 informativos para parcimônia. A proporção de mutações intraespecíficas em relação ao número de bases sequenciadas foi maior no gene *cytb* (14%; 97 mutações em 82 sítios informativos) do que no 12S (9,6%; 38 mutações em 30 sítios informativos). As sequências foram analisadas integralmente já que não apresentaram saturação em nenhuma das posições de códon (índice de saturação de sequências menor que o valor crítico, $I_{SS} < I_{SS,C}$). A composição de bases das sequências foi de acordo com o padrão encontrado no DNA mitocondrial de outros gecos (*cytb*: A=26%, T=24%, C=36%, G=15%; *cytb* 3ª posição de códon: A=33%, T=11%; C=49%; G=8%; 12S: A=30%, T=18%, C=31%, G=21%), com uma marcante deficiência de guanina principalmente para o *cytb* (Macey et al 1999; Harris, 2002; Chiari et al., 2009). Para o *cytb* não foram verificadas mutações do tipo inserção-deleção (que levam à alteração do módulo de leitura) nem mutações sem sentido (que geram um código de parada) enquanto que para

o 12S não ocorreram picos duplos nas sequências. Esses fatores indicam fortemente que possíveis cópias nucleares não foram erroneamente amplificadas.

A extensão de ocorrência de *Homonota uruguayensis*, que foi estimada a partir da união dos pontos de ocorrência extremos, tem uma área de cerca de 50.651km². Já a sua área de ocupação, a efetivamente ocupada pela espécie, é reduzida para cerca de 3.307 km².

3.1. Relações evolutivas

Os modelos evolutivos TN93 e HKY foram selecionados como sendo os mais adequados para explicar o padrão de variação nos genes *cytb* e 12S, respectivamente. Em ambos os casos, a variação da taxa evolutiva entre sítios foi modelada através de distribuição gama com uma proporção de sítios fixada como invariantes (+G+I). Diferentes estratégias de partição dos dados foram testadas através do fator de Bayes (Tabela 2), incluindo um modelo onde ambos os genes seguiram um mesmo modelo evolutivo. Nesse caso, foi utilizado o modelo GTR+G+I para permitir um modelo mais complexo quando nenhuma partição foi efetuada. Essas análises demonstraram um melhor ajuste dos dados ao modelo que trata independentemente cada posição de códon do gene *cytb*, e essa opção foi utilizada sempre que possível.

As árvores finais de ML e BI diferiram em alguns aspectos. Na árvore de ML (Figura 1 Material Suplementar), o grupo interno com todos os haplótipos de *H. uruguayensis* possui um suporte intermediário (Bootstrap = 70) e os haplótipos de Artigas aparecem como mais externos, porém com baixo valor de suporte. Já na árvore gerada por BI (Figura 2) o grupo interno apresenta valor máximo de suporte (Probabilidade posterior= 1.0) e os haplótipos de Cerro do Tigre formam um clado mais externo (Probabilidade posterior= 0.99). A análise de ML, apesar de utilizar um modelo complexo e a mesma partição dos genes da análise bayesiana, resultou em valores de suportes muito baixos, à exceção do nó que une todos os haplótipos da espécie, comprometendo a sua interpretação.

Para avaliar melhor os resultados divergentes apresentados nas duas análises, utilizamos o programa BEAST 1.6.2 para testar se havia uma diferença significativa no suporte entre essas topologias utilizando para o *cytb*, três partições independentes para cada posição de códon conforme sugerido pelo fator de Bayes. Dessa forma, a topologia obtida pela análise bayesiana foi comparada àquela gerada assumindo que o grupo de haplótipos de Artigas fosse o mais externo (como indicado pela árvore de ML). A comparação entre essas hipóteses topológicas distintas indicou que a topologia bayesiana, com CT como o grupo mais externo teve um log10 do fator de Bayes cerca de dezesseis vezes maior do que o da topologia originalmente obtida por ML (Tabela 2). A amplitude dessa diferença é substancial já que um resultado maior que duas vezes já é considerado decisivo (Kass & Raftery, 1995). Assim, a topologia obtida na análise bayesiana foi usada como base para a interpretação da história filogeográfica desse grupo.

As linhagens mitocondriais de *H. uruguayensis* aparecem divididas em quatro clados separados por mais de 1 milhão de anos de divergência (Figura 2): (I) a população CT de Alegrete isolada; (II) populações uruguaias de RIV, PAY e SAL; (III) FCB de Rosário do Sul e FSF de Alegrete; (IV) um grupo com as populações mais centrais da distribuição (A1, A2, BR293, CJ, CV e BR290) (abreviações listadas na Tabela 1). Em geral, os haplótipos de cada localidade ficaram agrupados, às exceções dos haplótipos da BR293 e de CV que se misturam dentro do grupo das populações centrais (clado IV). As populações uruguaias que formam o clado II e se localizam mais ao sul da distribuição da espécie aparecem como o segundo clado mais antigo enquanto que as populações centrais (clado IV) são as mais recentes.

Segundo as estimativas do relógio molecular, a separação entre as espécies de grupo externo *H. fasciata* e *H. borelli* teria ocorrido durante o Mioceno há cerca de 14,18 Ma (20,9 - 9,36 Ma), enquanto que a separação entre *H. borelli* e *H. uruguayensis* teria ocorrido na transição entre o Mioceno e o Plioceno, há 7,29 Ma (10,64 - 4,73 Ma). A coalescência de *H. uruguayensis* está no limite do Pleistoceno, por volta de 2,5 Ma (3,62 - 1,58 Ma) (Figura

3). A diversificação das linhagens dentro da espécie ocorreu continuamente durante o Pleistoceno até cerca de 250.000 anos atrás, sendo que as separações mais expressivas se deram dentro de um período de um milhão de anos desde a coalescência da espécie.

A diversidade haplotípica da espécie em geral foi alta ($H_d=0,97$), mas apresenta considerável variação entre as suas populações (Tabela 1). As populações mais centrais da distribuição (CJ, BR293, CV e A1) seguidas de CT são as que apresentam os maiores valores, já as populações de SAL, FCB e A2 apresentam diversidade nula ou muito baixa. A rede de haplótipos dos genes concatenados mostra que não existem cópias gênicas compartilhadas entre as localidades, sendo 64% dos haplótipos representados por apenas um indivíduo (Figura 4). Somente quando são considerados os genes separadamente, aparece o compartilhamento de um haplótipo do gene 12S indivíduos das populações BR293 e CV, indicando uma maior proximidade filogenética entre haplótipos presentes nessas populações. Observando a rede de haplótipos podemos distinguir as mesmas quatro linhagens vistas na árvore filogenética, mas ela evidencia a grande distância genética existente entre os clados: o grupo das populações da região central (clado IV) é mais coeso; enquanto que os haplótipos da população CT (clado I) está distante desse grupo em no mínimo 40 passos mutacionais; as populações FCB e FSF (clado III) se diferenciando por no mínimo 18 mutações; e a linhagem com as populações uruguaias SAL, RIV e PAY (clado II) se diferenciando por no mínimo 20 passos de CT. A forte estruturação entre as localidades amostradas também é verificada nos altos valores resultantes da análise de Φ_{ST} (Tabela 3) que variaram de 0.24 entre Cerros Verdes e BR293, até quase o valor máximo, 0.99 entre as populações de SAL e CT. Os valores entre as populações do clado IV (0,24 – 0,85) foram menores quando comparados aos valores dentro do clado II (0,90 – 0,98), e entre clado I e III e os demais (0,80 – 0,98).

As distâncias genéticas entre as populações da espécie e os grupos externos variam de 16.1 a 17.4% para *H. fasciata* e de 10.6 a 11.5% para *H. borelli* (Tabela 3). A variação dentro de *H. uruguayensis* é de 2.4% para os genes concatenados, 2.7% considerando só o

cytb e 1.7% para o 12S. Entre as populações de *H. uruguayensis*, as distâncias vão de 0.6 a 5.4% enquanto que a nível intrapopulacional vão de 0 a 0.7%. Considerando as principais linhagens, a maior divergência se dá entre o clado II e I com 5%, seguido de 4% entre clado I e clados III + IV, 3.3% entre clado II e III + IV, e 2.2% entre clados III e IV. Assim como nos valores de Φ_{ST} , os valores encontrados entre as populações do clado IV (0,008 – 0,020) foram menores que entre os outros clados: FCB+FSF e outros clados (0,021 – 0,042), CT e outros (0,038 – 0,054), entre clado II (0,020 – 0,029). Segundo o resultado do teste de Mantel, a distância geográfica explica cerca de 40% da variação genética encontrada ($r^2=0.394$, $p=0.0009$), indicando que o isolamento por distância tem um papel importante na estrutura genética da espécie.

O BSP feito para a espécie em geral revelou estabilidade no tamanho populacional ao longo da maior parte do tempo, com um leve sinal de expansão iniciado há cerca de 200.000 anos culminando em um pico populacional por volta de 70.000 anos seguido de um declínio até os dias atuais (Figura 5a). De fato, algumas populações centrais mostraram sinais de expansão populacional em testes de neutralidade (BR290 e A2 para o D de Tajima e CV para o F_s de Fu - Tabela 1). Assim, realizamos a mesma análise considerando separadamente as populações centrais (CV, BR290, CJ, BR293, A1 e A2) e as restantes. Os gráficos apresentaram dinâmicas populacionais diferentes nos dois grupos que foram mascaradas na análise da espécie como um todo ao serem 'somadas', mostrando uma tendência geral. O grupo com as populações centrais passou por uma aparente maior instabilidade demográfica sofrendo uma expansão iniciada há cerca de 250.000 anos, chegando ao pico populacional há 40.000 anos seguido de um pequeno declínio até o presente (Figura 5b). Já o grupo com as populações restantes mostra uma tendência de estabilidade na maior parte do tempo sem nenhuma expansão aparente e um declínio mais brusco a partir de 60.000 anos atrás (Figura 5c). Considerando os valores do BSP da espécie como um todo, e um valor de geração mínimo de 5 anos (estudo com *H. darwini*, Piantoni et al., 2006), no seu pico populacional *H. uruguayensis* atingiu um N_{ef} de cerca de

520.000 fêmeas. Após o declínio observado, sua população aparentemente foi reduzida em 70%, resultando em N_{ef} de 157.000 fêmeas.

Pelos resultados obtidos do programa LAMARC (Tabela 4), a população de CV apresenta o maior tamanho populacional efetivo de fêmeas cerca de dez vezes maior do que o de qualquer outra localidade. Em contraste, a população de SAL possui um valor theta muito pequeno, como esperado dado que essa localidade possui apenas um haplótipo. Quanto ao crescimento, podemos afirmar apenas que CV apresentou um crescimento significativo, pois foi a única população na qual o limite inferior do intervalo de confiança foi positivo.

3.2. Morfologia

As variáveis CCab e LCab assim como CPes e LPes não foram correlacionadas, portanto todas foram utilizadas nas análises. Na análise de dimorfismo sexual, seis das dezesseis variáveis diferiram significativamente (CCab, LCab, LPes, CPes, C3pos e C4pos) e portanto consideramos separadamente os sexos nas análises posteriores. A distribuição dos indivíduos se deu da seguinte forma entre as populações: Artigas 1 (3F, 5M), Artigas 2 (7F, 3M), BR 290 (4F, 6M), BR 293 (3F, 2M), Cerro do Jarau (6F, 3M), Cerro do Tigre (5F, 4M), Cerros Verdes (3F, 4M), Fazenda Casa Branca (5F, 5M), Paysandu (4F, 5M), Rivera (2F, 1M) e Salto (2F, 2M). A localidade de Rivera não pode ser considerada na análise de machos devido ao tamanho amostral insuficiente.

Diferenças significativas na média de CRC entre as localidades somente foram encontradas em machos de CT que foram maiores em comparação com CV e PAY. A análise discriminante realizada com as fêmeas totalizou 8 passos (Wilks' Lambda: 0.0069; $F_{(80,173)}=2.5833$, $p<0.000$) enquanto que nos machos foram 12 passos (Wilks' Lambda: 0.0018; $F_{(108,143)}=1.8188$, $p<0.0004$). As variáveis mais importantes para a discriminação das fêmeas das populações foram: CPes, CFoc, CAx-vir, LPes e CBr. Nos machos as variáveis foram CCab, CFemur, CPes e C4pos. A análise classificou corretamente dentro de cada

população em média 82% tanto dos machos quanto das fêmeas, sendo que as populações de CJ, CT e ART2 obtiveram 100% de acerto em ambos os sexos.

Na MANOVA das fêmeas, utilizando a comparação par a par de Hotelling e admitindo $\alpha = 0.05$, a população de CT diferiu de SAL, BR290, ART2 e CJ; FCB diferiu de BR290, CV e CJ; ART1 de BR290 e ART2; CJ de ART2 e BR293. Entre machos menos populações diferiram significativamente: CT e BR290; BR290 de PAY e BR 293; SAL de ART1; ART2 de PAY. Os gráficos de CVA para fêmeas e machos tiveram o eixo 1 explicando 45 e 52% da variação, e o eixo 2, 38 e 25%, respectivamente, separando no gráfico gerado algumas das localidades acima citadas (Figura 6). A análise morfológica realizada deve ser interpretada com cautela devido a pequena quantidade de indivíduos analisados, porém, apresentando resultados significativos, reflete a existência de uma tendência a diferenciação entre algumas populações, o que pode ser comparado aos resultados moleculares.

4. Discussão

4.1. Estruturação filogeográfica e história demográfica

As populações de *H. uruguayensis* apresentam uma forte estruturação em grupos geograficamente distintos. Os valores de distância genética entre algumas populações e entre os clados da árvore filogenética foram altos e comparáveis a valores encontrados entre espécies de lagartos, como por exemplo, da família Lacertidae, que apresentam distâncias interespecíficas que variam de 2,5 a 6,4% para o gene 12S (Ljubisavljevic et al., 2007). Porém, devido à alta taxa de evolução do DNA mitocondrial relatada para várias espécies de gecos em relação a outros lagartos e vertebrados (Austin et al., 2004, Harris et al., 2004a, Jesus et al., 2005), acreditamos que esse tipo de comparação deva ser realizada apenas dentro desse grupo a fim de evitar superestimar o número de possíveis espécies crípticas. Ainda assim, mesmo considerando um gênero de gecos que também pertence à

Phyllodactylidae, as distâncias corrigidas (Kimura 2 parâmetros) entre subespécies e espécies de *Tarentola* para os mesmos genes mitocondriais do presente estudo (3 a 9%; Carranza et al., 2000) são semelhantes às encontradas dentro de *H. uruguayensis*. Esse mesmo modelo evolutivo leva a distâncias de até 6,5% entre os haplótipos de CT e os do clado II, e de 5% em relação aos outros clados. Esse alto grau de diferenciação genética somada à distinção morfológica exibida por essa população pode ser indicativa de um processo de especiação em andamento na população de CT.

Considerando o alto nível de divergência encontrado no DNA mitocondrial, é surpreendente não encontramos nenhuma variação no fragmento do gene nuclear sequenciado, porém outros estudos também relatam a falta, ou baixa variabilidade do DNA nuclear em gecos (Harris, 2004b; Jesus et al., 2005, 2006; Blair et al., 2009). A preservação do haplótipo nuclear pode estar ligada à migração preferencial dos machos, o que homogeneizaria geneticamente as populações, ou pelo fato de não haver passado tempo suficiente para a acumulação de polimorfismos. Um estudo populacional realizado na localidade de Fazenda Casa Branca (FCB), Rosário do Sul, uma área de campos com afloramentos que totaliza 4,13ha, constatou que os machos de *H. uruguayensis* possuem uma aparente baixa mobilidade, apresentando área de vida média de 24m² e deslocamento máximo observado de apenas 82m (Vieira, 2012). Por outro lado, a distância mínima entre as populações amostradas nesse estudo é de 25km. Além disso, a homogeneização genética causada pela migração não implica necessariamente em um baixo polimorfismo global, mas sim em um polimorfismo compartilhado entre populações. Esses fatores tornam mais provável a hipótese de que a taxa evolutiva para genes nucleares, pelo menos para esse grupo de organismos, é baixa em relação ao tempo decorrido desde o isolamento das linhagens de *H. uruguayensis*. Em consonância com essa interpretação, um estudo com espécies e subespécies de *Hemidactylus*, cuja coalescência foi estimada em torno de 17Ma mostrou apenas uma ou duas mutações em um outro gene nuclear, RAG2 (Arnold et al., 2008).

Unindo os resultados genéticos encontrados com os dados ecológicos da espécie, que apontam uma baixa mobilidade também para fêmeas (deslocamento máximo de 190m) (Vieira, 2012), e com as análises morfológicas que apresentam diferenças significativas entre várias populações, temos um cenário bem suportado de isolamento entre os afloramentos rochosos. *Homonota uruguayensis* é uma espécie que possui uma grande especificidade quanto ao tipo de habitat, e aparentemente, após encontrar um ambiente favorável para seu estabelecimento com abundância de alimento e abrigo, eventos de dispersão e migração parecem ser raros, causando o interrompimento do fluxo gênico entre as populações e as tornando cada vez mais isoladas com o passar dos anos.

Como as estimativas demográficas foram baseadas apenas nos genes mitocondriais, as estimativas de parâmetros populacionais possuem intervalos de confiança amplos, dificultando interpretações precisas. Entretanto, é claro que existem diferenças importantes de tamanho populacional e de história demográfica entre algumas populações. A população CV, por exemplo, possui maior número efetivo de fêmeas entre as populações analisadas e evidências de crescimento populacional. No caso da população de SAL, a falta de variação genética nas suas sequências é um claro sinal de um tamanho populacional reduzido, mas isso também impede uma correta precisão do padrão demográfico dessa população já que, a princípio, uma população invariante pode ou estar no estágio final de um efeito de gargalo de garrafa intenso ou na fase inicial de um crescimento populacional sem que tenha havido tempo para o aparecimento de novas variantes. Dessa forma, as estimativas populacionais para essa população foram realizadas sob o pressuposto de uma população de tamanho constante. Observações de campo realizadas no presente trabalho corroboram as estimativas de baixo tamanho populacional para essa localidade. Dados para outros marcadores genéticos independentes serão necessários para diminuir o intervalo de confiança dessas estimativas.

4.2. Biogeografia e hipóteses de colonização

O período compreendido entre o final do Oligoceno e início do Mioceno foi uma época de diversificação para vários grupos de animais sul-americanos, sendo vital no desenvolvimento da diversidade biológica da América do Sul (ver exemplos em Gamble et al., 2008a). A origem de *Homonota* parece coincidir com esse período, considerando a idade mínima estimada de 25 Ma para a separação de *H. fasciata* e *H. darwini* (Gamble et al., 2010 que teria ocorrido possivelmente entre o norte da Argentina e a porção sudoeste da faixa da diagonal de formações abertas que vai do nordeste do Brasil ao Chaco (Vanzolini, 1968). É provável que os ancestrais do gênero tenham conseguido se adaptar bem às temperaturas amenas e áreas abertas dessa região, que passava por um período de expansão das gramíneas desde o Oligoceno (Ortiz-Jaureguizar and Cladera 2006), e tenham se expandido na região Andino-Patagônica. Entre o Mioceno Inferior e Médio, o nível do mar se elevou e invadiu a América do Sul ao norte na região amazônica (Mar Amazônico) e ao sul, o chamado Mar Paranaense submergiu grande parte dos pampas argentinos e uma parte da borda oeste do Uruguai e sul do Brasil, sendo limitado a oeste pela cadeia andina e a leste pelo Escudo Brasileiro (Räsänen et al., 1995; Webb, 1995; Marshall & Lundberg, 1996). Essa transgressão marinha foi uma importante barreira geográfica para a fauna continental pampeana e andina (Aceñolaza, 2004). Durante o Mioceno Superior-Plioceno Inferior houve a retração do mar, dando lugar a planícies extensas que cobriram a área do norte da Patagônia até o Uruguai e o norte da Argentina, com uma expansão simultânea das savanas herbáceas e das pastagens (Pascual et al. 1996; Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006; Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2010). Esses eventos de transgressão e posterior expansão dos campos certamente tiveram um papel importante na dinâmica do gênero, primeiramente isolando e extinguindo populações ancestrais e posteriormente, abrindo uma nova zona adaptativa e permitindo a invasão e diversificação de linhagens na região (Crisp et al. 2009).

A distribuição de *Homonota uruguayensis* é restrita à porção sudoeste da região basáltica da Formação Serra Geral, que foi originada em um dos maiores eventos vulcânicos da história geológica, ocorrido durante o Cretáceo Inferior (entre 137 e 127 Ma) (Lavina & Fauth, 2010). Os limites de ocorrência da espécie parecem ser os principais rios da bacia do Rio Uruguai (Figura 1), esse limitando a distribuição a oeste. Ao norte, o Rio Ibicuí, e ao sul, o Rio Negro, onde existe registro da espécie com localização adjacente à sua margem norte (Carreira et al., 2005) parecem funcionar também como limites da distribuição dessa espécie. O Rio Ibicuí figura como um possível limitante norte já que foram realizadas buscas por populações na margem oposta à população de CT, nos municípios de Manoel Viana e São Francisco de Assis, onde existem afloramentos de basalto muito semelhantes aos ocupados pela espécie ao sul, e não obteve-se sucesso em encontrar indivíduos. Tendo em vista a facilidade de observação e coleta de indivíduos dessa espécie em qualquer época do ano, a notável ausência de espécimes na margem norte do Rio Ibicuí nos leva a acreditar numa real barreira para a espécie. De fato, a presença de grandes rios pode afetar a distribuição e fluxo gênico de espécies de baixa mobilidade (Pellegrino et al., 2005; Torres-Pérez et al., 2007) e o Rio Ibicuí, inclusive, já foi apontado como uma barreira geográfica para *Ctenomys torquatus*, separando localidades que possuem diferentes cariótipos (Fernandes et al., 2009). Por outro lado, rios de menor porte, como o Rio Quaraí, na fronteira entre o Brasil e o Uruguai podem não ter sido barreiras efetivas, já que não há sinais de isolamento entre as populações de *H. uruguayensis* de ambas as margens.

Segundo a reconstrução filogenética da árvore Bayesiana, a população de Cerro do Tigre contém as linhagens mitocondriais que se diferenciaram há mais tempo dentro da espécie. Essa constatação parece bastante razoável já que ao analisarmos sob o ponto de vista de um relógio molecular, deve-se considerar que para ocorrer a grande quantidade de mutações acumuladas em CT deveria ser necessário um tempo de existência e isolamento maior dessa população em relação às outras. Por outro lado, a topologia da árvore de ML sugere um enraizamento na população de ART1. Nesse caso, o grande número de

mutações exclusivas das linhagens de CT seria explicada por uma aceleração da taxa de mutação especialmente naquela população. Essa segunda possibilidade parece menos provável, uma vez que eventos de aceleração intraespecífica na taxa evolutiva de genes mitocondriais nunca foram reportados na literatura. Além disso, recentemente foi encontrada uma população de uma possível nova espécie de *Homonota* isolada em cerros da província argentina de Corrientes, muito próximos à fronteira com o Rio Grande do Sul (Etchepare et al., 2011) e a 153 km da população CT. Esses dados permitem inferir que uma hipótese provável para a origem de *H. uruguayensis* envolve o estabelecimento de uma população no sudoeste do Rio Grande do Sul após a transposição, por um ancestral, do rio Uruguai, que já estava presente e com o mesmo curso ao menos desde o Plioceno (Panario et al., 1999), ou através de uma dispersão terrestre em algum período de baixa do nível desse rio como, por exemplo, durante a desconexão do Rio Uruguai com o Alto Paraná durante o Mioceno, por volta de 9.3 Ma (Montoya-Burgos, 2003), alteração que em algum nível instabilizou o regime fluvial da região na época. Encontrando um habitat adequado para o seu estabelecimento em afloramentos basálticos de áreas abertas, a espécie teria iniciado uma expansão norte-sul, aparentemente seguindo via a região elevada da Coxilha de Haedo, que penetra em território Uruguaio e que, devido à erosão, é separada em numerosos cerros isolados ou dispostos em fileiras (Giraldéz et al., 2009). Uma expansão antiga na direção Norte-Sul através da Coxilha de Haedo poderia explicar a posição dos haplótipos do clado II, referentes às populações uruguaias PAY, RIV e SAL, como os mais externos à exceção do clado I. Essa formação pode ter apresentado alguma importância na história evolutiva dos organismos da região, sendo inclusive citada como um centro de refúgio para *Turnera sidoides* durante as alterações climáticas do Quaternário (Speranza et al., 2007).

As populações cujos haplótipos compõem o clado IV parecem ter uma dinâmica diferente das outras populações da espécie. A posição mais derivada desse grupo na árvore filogenética associada a fatores como a maior ligação na rede de haplótipos, com compartilhamento de cópia do gene 12S entre duas populações, menores valores de

distância genética e de Φ_{ST} , e a tendência de expansão populacional mostrada no BSP, nos permite supor que essas populações seriam mais recentes e menos estruturadas entre si. A partir disso, podemos recriar um cenário histórico no qual durante a expansão nortesul da espécie, nem todas as populações conseguiram se estabelecer a longo prazo entre esses extremos, sendo essa região central recolonizada posteriormente. Após a fixação dessas populações um evento de expansão demográfica ocorreu nessa região. As populações-chave dessa recolonização parecem ser a BR 293, que aparece nos dois subgrupos do clado IV e talvez devido a sua localização central tenha tido uma ligação maior com diversas populações, e CV que possui um grande número de indivíduos, podendo ser uma região-fonte para a expansão verificada.

Inúmeros trabalhos citam as alterações climáticas do Pleistoceno como os eventos principais na diferenciação de espécies (e.g. Avise et al., 1998; Hewitt, 2000; Shepard & Burbrink, 2009; Miraldo et al., 2011; Nuñez et al., 2011). Apesar da estruturação entre as populações de *H. uruguayensis* ter ocorrido durante o período Pleistocênico, nossos dados não mostram evidências de que as mudanças climáticas ocorridas nesse período tenham tido influência direta nesse processo. Os afloramentos em que a espécie habita podem ter inclusive fornecido uma certa estabilidade térmica devido aos microclimas que possuem na sua estrutura complexa (fendas, pedras sobrepostas). A diferenciação encontrada dentro da espécie parece ser devida a eventos raros de colonização e posterior isolamento, sem que o surgimento de novas barreiras geográficas ou mudanças climáticas tenham tido uma influência fundamental nesse processo.

Infelizmente, são poucos os estudos de filogeografia realizados para organismos da Savana Uruguaia, o que dificulta a comparação dos padrões filogeográficos sugeridos por esses dados. Sem dúvida estudos de filogeografia comparada da fauna e da flora do Pampa seriam de grande importância para um melhor entendimento de padrões bio e filogeográficos nessa região.

4.3. Implicações para a Conservação

Apesar da considerável divergência genética entre algumas populações de *H. uruguayensis*, principalmente a de Cerro do Tigre, outras informações ecológicas e genéticas devem ser analisadas para que possamos compreender melhor seu estado como unidade evolutiva. Não é adequado basear decisões sobre a classificação específica ou subespecífica apenas a análises de DNA mitocondrial (ver Patton & Smith 1994; Rubinoff et al., 2006).

Ainda assim, existe uma estruturação filogeográfica considerável para essa espécie, e a relevância para conservação dessa estruturação cresce se levarmos em conta que o seu isolamento histórico e atual (acentuado pela crescente fragmentação de habitat causada pela ação humana) provavelmente resultará em um destino evolutivo independente para cada grupo (Eizirik, 1996). O grau de divergência entre os clados é suficiente para que possamos classificar as populações de CT e as constituintes dos clados II e III como Unidades Evolutivamente Significativas, enquanto que as populações pertencentes ao clado IV, que embora não estejam separadas de maneira tão profunda em termos filogenéticos, não compartilham nenhum haplótipo mitocondrial, poderiam ser classificadas como Unidades de Manejo (Moritz, 1994).

Dentre todas as populações estudadas nesse trabalho, a de CV é a única que se encontra, pelo menos em parte, protegida pela Área de Proteção Ambiental do Rio Ibirapuitã, que possui cerca de 313.800 ha (Couto, 2004). Como a proteção de todos os afloramentos é inviável em termos práticos de legislação, a partir dos dados de variabilidade genética e distinção filogenética sugerimos que as populações CT, FCB, CV, ART1 e PAY sejam consideradas prioritárias para conservação. Em termos gerais, essas localidades são as que possuem maiores áreas de afloramento, o que parece estar bem relacionado com o tamanho da população e maior diversidade. Além disso, essas populações compreendem todos os principais clados mitocondriais observados. Finalmente, sugerimos que *H. uruguayensis* sofra uma reavaliação do seu *status* de conservação já que, devido à sua

distribuição restrita e descontínua, reduzindo-se a manchas de afloramentos existentes na região, e também ao isolamento das suas populações, sem fluxo gênico aparente, a espécie mereça uma atenção especial na questão conservacionista.

Agradecimentos

Agradecemos a permissão de coleta emitida pelo SISBIO e pela colaboração de Raul Maneyro com as coletas no Uruguai. Mariana Morando por gentilmente enviar tecidos de outras espécies do gênero. CNPq pela bolsa concedida e projetos nº 479412/2008-1 e Universal pelo suporte ao laboratório e auxílio financeiro.

Referências

- Abdala, V., 1998. Análisis cladístico de las especies del género *Homonota* (Gekkonidae). Ver. Esp. Herp. 12, 55-62.
- Achaval, F., Olmos, A. 2007. Anfíbios y Reptiles del Uruguay. Serie Fauna no 1. 3ª ed. corregida y aumentada. Zonalibro Industria Gráfica, Montevideo, Uruguay, 160p.
- Aceñolaza, F.G. 2004. Paleobiogeografía de la Región Mesopotámica. Miscelánea, 12, 25–30.
- Arnold, E.N., Vasconcelos, R., Harris, D.J., Mateo, J.A., Carranza, S. 2008. Systematics, biogeography and evolution of the endemic *Hemidactylus geckos* (Reptilia, Squamata, Gekkonidae) of the Cape Verde Islands: based on morphology and mitochondrial and nuclear DNA sequences. Zoologica Scripta 37 (6), 619-636.
- Austin, J.J., Arnold, E.N., Jones, C.G. 2004. Reconstructing an island radiation using ancient and recent DNA: the extinct and living day geckos (*Phelsuma*) of the Mascarene islands. Molecular Phylogenetics and Evolution 31, 109-22.
- Ávila, L.J., Morando, M., Sites, J.W., 2006. Congeneric phylogeography: hypothesizing species limits and evolutionary processes in Patagonian lizards of the *Liolaemus boulengeri* group (Squamata: Liolaemini). Biological Journal of the Linnean Society 89 (2), 241-275.
- Avise, J.C., Walker, D., Johns, G.C. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. Proc. R. Soc. Lond. B 265, 1707-1712.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohlf, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16, 37-48.
- Beheregaray, L. B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. Molecular Ecology 17, 3754-3774.
- Bergmann, P.J., Russell, A.P. 2007. Systematics and biogeography of the widespread Neotropical gekkonid genus *Thecadactylus* (Squamata), with the description of a new cryptic species. Zoological Journal of the Linnean Society 149, 339-370.
- Bérnils, R. S. & H. C. Costa (org.). 2011. Brazilian reptiles – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em dezembro de 2011.
- Bibby, C.J. (1998) Selecting areas for conservation. In: Conservation Science and Action (ed. W.J. Sutherland), pp. 176–201. Blackwell Science, Oxford, UK.

- Bilenca, D. & Miñarro, F. (Org.). 2004. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. 1 ed. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre Argentina, 352p.
- Blair, C., Méndez de La Cruz, F.R., Ngo, A., Lindell, J., Lathrop, A., Murphy, R.W. 2009. Molecular phylogenetics and taxonomy of leaf-toed geckos (Phyllodactylidae: *Phyllodactylus*) inhabiting the peninsula of Baja California *Zootaxa* 2027, 28 - 42.
- Bonvicino, C.R., Moreira, M.A.M. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18, 282-292.
- Calcagnotto, D. 2001. Taxa de evolução e o relógio molecular, p. 51 – 63. In: Matioli, S. R. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, Holos Editora, 202 p.
- Camargo, A., Sinervo, B., Sites, J.W., 2010. Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology* 19, 3250-3270.
- Canavero, A., Carreira, S., Langone, J.A., Achaval, F., Borteiro, C., Camargo, A., da Rosa, I., Estrades, A., Fallabrino, A., Kolenc, F., López-Mendilaharsu, M.M., Maneyro, R., Meneghel, M., Nuñez, D. 2010. Conservation status assessment of the amphibians and reptiles of Uruguay. *Iheringia* 100(1), 5-12.
- Carranza, S., Arnold, E.N., Mateo, J.A., López-Jurado, L.F. 2000. Long-distance colonization and radiation in gekkonid lizards, *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae), revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proc.R. Soc. Lond. B* 267 (April): 637-649.
- Carreira, S., Meneghel, M., Achaval, F. 2005. *Reptiles del Uruguay*. Facultad de Ciencias, Univ. de La República, Montevideo.
- Chiari, Y., Vieites, D.R. 2009. High haplotype diversity in a microendemic Malagasy gecko species, *Lygodactylus mirabilis* (Pasteur, 1962). *Zootaxa* 2269, 43-52.
- Couto, R. G. 2004. *Atlas de Conservação da Natureza Brasileira – Unidades Federais*. São Paulo: Metalivros.
- Crisp, M.D., Arroyo, M.T.K., Cook, L.G., Gandolfo, M.A., Jordan, G.J., McGlone, M.S., Weston, P.H., Westoby, M., Wilf, P., Linder, H.P. 2009. Phylogenetic biome conservatism on a global scale. *Nature* 458, 754-756.
- Dinerstein, E., Olson D. M., Graham, D. J., Webster, A. L., Primm, S. A., Bookbinder, M. P., Ledec, G. 1995. *A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean*. Washington (DC): World Bank.

- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS biology* 4 (5), 699-710.
- Drummond A. J. & Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7, 214
- Eizirik, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics* 19(4), 23-29.
- Etchepare, E., Cajade, R., Falcione, C., Barrasso, D.A. 2011. Una nueva especie de *Homonota* (Sauria, Phyllodactylidae) de Corrientes, Argentina. IX Congreso Latinoamericano de Herpetología, Curitiba, Brasil. CD de Resumos.
- Excoffier, L. & H.E. L. Lischer 2010 Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-567.
- Fernandes, F.A., Gonçalves, G.L., Ximenes, S.S.F., de Freitas, T.R.O. 2009. Karyotypic and molecular polymorphisms in *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae): taxonomic considerations. *Genetica* 136, 449–459
- Gamble, T.; Bauer, A.M.; Greenbaum, E., Jackman, T.R. 2008a. Out of the blue: a novel, trans-Atlantic clade of geckos (Gekkota, Squamata). *Zoologica Scripta*, 37, 355–366.
- Gamble, T., Simons, A.M., Colli, G.R., Vitt, L.J. 2008b. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 269-277.
- Gamble, T., Bauer, A.M., Colli, G.R., Greenbaum, E., Jackman, T.R., Vitt, L.J., Simons, A.M. 2010. Coming to America: multiple origins of New World geckos. *Journal of Evolutionary Biology*, 1-14.
- Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., Werneck, F.P., Simons, A.M., 2012. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (*Phyllopezus*; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America's open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 943-953.
- Garcia., P.C.A., Lavilla, E., Langone, J., Segalla, M.V. 2007. Anfíbios da região subtropical da América do Sul – padrões de distribuição (pgs. 65-100). Em: *Ciência & Ambiente, Fauna Neotropical Austral* 1(35), 216 pgs.
- García, G., Vergara, J., Lombardi, R. 2011. Genetic characterization and phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced into Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 34 (2), 329-37.

- Giraldéz, G., Carrasco-Letelier, L., Olivera, L., Sawchik, J. 2009. Definición de unidades territoriales homogéneas para el estudio y gestión ambiental en cuencas con aptitud forestal. 12vo Encuentro de Geógrafos de América Latina. Montevideo, Uruguay. Disponible online em: http://egal2009.easyplanners.info/area04/4191_Giraldez_Gonzalo.pdf
- González, S.; Maldonado, J.E., Leonard, J.A., Vilà, C., Duarte, J.M.B., Merino, M., Brum-Zorrilla, N., Wayne, R.K. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology* 7: 47-56.
- Gudynas, E. 1986. Notes on the behavior of *Homonota uruguayensis* with special reference to elevated postures. *CIPFE CED Orione Cont. Biol.*, 14:1-10.
- Gudynas, E., Gambarotta, C., 1980. Notes on the ecology of the Gekkonid lizard *Homonota uruguayensis*. *ASRA JOURNAL* 1(3), 13-26.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Hammer, O.; Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 pp.
- Harris, D.J. 2002. Reassessment of comparative genetic distance in reptiles from the mitochondrial cytochrome B gene. *Herpetological Journal* 12, 85-86.
- Harris, D.J., Batista, V., Lymberakis, P., Carretero, M.A. 2004a. Complex estimates of evolutionary relationships in *Tarentola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae) derived from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30 (3): 855-9.
- Harris, D.J., Batista, V., Carretero, M.A., Ferrand, N. 2004b. Genetic variation in *Tarentola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae) across the Strait of Gibraltar derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Amphibia-Reptilia* 25, 451-459.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones and A. Jarvis, 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25, 1965-1978.
- IUCN, 2010. Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Disponible em: <http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/RedList/RedListGuidelines.pdf> Acesso em: março/2012.

- Jesus, J., Brehm, A., Harris, D.J. 2005. Phylogenetic relationships of *Hemidactylus* geckos from the Gulf of Guinea islands: patterns of natural colonizations and anthropogenic introductions estimated from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34, 480-485.
- Jesus, J., Brehm, A., Harris, D.J., 2006. Phylogenetic relationships of *Lygodactylus* geckos from the Gulf of Guinea Islands: rapid rates of mitochondrial DNA sequence evolution? *Herpetol. J.* 16, 291–295.
- Kasapidis, P., Magoulas, A., Mylonas, M., Zouros, E. 2005. The phylogeography of the gecko *Cyrtopodion kotschy* (Reptilia: Gekkonidae) in the Aegean archipelago. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 612-23.
- Kass, R.E, Raftery, A.E. 1995. Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association* 90, 377-395.
- Katoh, K., Toh, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9 (4), 286-98.
- Kluge, A. G. 1964. A Revision of the South American Gekkonid Lizard Genus *Homonota* Gray. *American Museum Novitates* 2193, 1-41
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. 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.
- Kronauer, D. J. C., Bergmann, P. J., Mercer, J. M., Russell, A. P. 2005. A phylogeographically distinct and deep divergence in the widespread Neotropical turnip-tailed gecko, *Thecadactylus rapicauda*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34, 431-7.
- Kuhner, M.K. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22, 768-770.
- Lavina E.L. & Fauth G. 2010. Evolução geológica da América do Sul nos últimos 250 milhões de anos. In: Carvalho C. & Almeida E. (eds.) *Biogeografia da América do Sul: padrões e processos*. Editora Roca.
- Ljubisavljevic, K., Arribas, O., Dzukic, G., Carranza, S. 2007. Genetic and morphological differentiation of Mosor rock lizards, *Dinarolacerta mosorensis* (Kolombatović, 1886), with the description of a new species from the Prokletije Mountain Massif (Montenegro) (Squamata: Lacertidae). *Zootaxa* 1613, 1-22.

- Macey, J.R., Wang, Y., Ananjeva, N.B., Larson, A., Papenfuss, T.J. 1999. Vicariant patterns of fragmentation among gekkonid lizards of the genus *Teratoscincus* produced by the Indian collision: A molecular phylogenetic perspective and an area cladogram for Central Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12(3), 320-332.
- Marshall, L.G., Lundberg, J.G. 1996. Technical Comments. *Science* 273, 123-124.
- Medrano J.F.; Aasen, E., Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8(1), 43.
- Miller, M.P. 2005. Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96, 722–724.
- Miraldo, A., Hewitt, G.M., Paulo, O.S., Emerson, B.C. 2011. Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC Evolutionary Biology* 11(170), 1-19.
- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 12, 1855-1867.
- Morais, A.B.B., Romanowski, H.P., Iserhard, C.A., Marchiori, M.O.O., Seguí, R. 2007. Mariposas del sur de Sudamérica (Lepidoptera: Hesperioidea y Papilionoidea) (pgs. 29-46). Em: *Ciência & Ambiente, Fauna Neotropical Austral* 1(35), 216pgs.
- Morando, M., Ávila, L.J., Turner, C.R., Sites, J.W., 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(3), 952-973.
- Morando, M., Ávila, L.J., Turner, C.R., Sites, J.W., 2008. Phylogeography between valleys and mountains: the history of populations of *Liolaemus koslowskyi* (Squamata, Liolaemini). *Zoologica Scripta* 37(6), 603-618.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9, 373-375.
- Núñez, J.J., Wood, N.K., Rabanal, F.E., Fontanella, F.M., Sites, J.W. 2011. Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58, 343-352.
- Oliver, P. M., Adams, M., Lee, M. S. Y., Hutchinson, M. N., Doughty, P. 2009. Cryptic diversity in vertebrates: molecular data double estimates of species diversity in a

- radiation of Australian lizards (*Diplodactylus*, Gekkota). Proceedings of The Royal Society 276, 2001-2007.
- Ortiz-Jaureguizar, E., Cladera, G.A. 2006. Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. Journal of Arid Environments 66, 498-532.
- Panario, D., Gutiérrez, O. 1999. The continental Uruguayan Cenozoic: an overview. Quaternary International 62, 75-84.
- Pascual, R.; Ortiz-Jaureguizar, E.; Prado, J. L. 1996. Land mammals: paradigm for Cenozoic South American geobiotic evolution. In: Arratia, G. Contribution of Southern South America to Vertebrate Paleontology. Müncher Geowiss Abh (A), 30, 265-319.
- Patton, J.L., Smith, M.F. 1994. Paraphyly, polyphyly, and the nature of species boundaries in pocket gophers (genus *Thomomys*). Syst Biol. 43, 11–26.
- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Waite, A. N., Morando, M., Yassuda, Y. Y., Sites, J. W. 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.
- Perera, A. & Harris, D. J. 2010. Genetic variability within the Oudri's fan-footed gecko *Ptyodactylus oudrii* in North Africa assessed using mitochondrial and nuclear DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 54, 634-9.
- Peters, J. A. & Donoso-Barros. 1970. Catalogue of the Neotropical Squamata, Part II: Lizards and Amphisbaenians. Bulletin of United States National Museum, 297:1-293.
- Piantoni, C., Ibarquengoytía, N.R., Cussac, V.E. 2006. Growth and age of the southernmost distributed gecko of the world (*Homonota darwini*) studied by skeletochronology. Amphibia-Reptilia 27, 393-400.
- Pook, C.E., Wüster, W., Thorpe, R.S. 2000. Historical biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus viridis*), inferred from mitochondrial DNA sequence information. Molecular Phylogenetics and Evolution 15, 269-282.
- Poljak, Sebastián, Viviana Confalonieri, Mariana Fasanella, Magalí Gabrielli, and Marta Susana Lizarralde. 2010. Phylogeography of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae Xenarthra): post-glacial range expansion from Pampas to Patagonia (Argentina). Molecular Phylogenetics and Evolution 55, 38-46.
- Posadas, P. & Ortiz-Jaureguizar, E. 2010. Evolução da Região Andina da América do Sul. (pgs. 175-188) In: Biogeografia da América do Sul: padrões e processos. Carvalho, C. J. B. de & Almeida, E. A. B. Organizadores. São Paulo, Roca, 306 pgs.

- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2009. Tracer version 1.5.0. <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- Räsänen, M.E., Linna, A.M., Santos, J.C., Negri, F.R. 1995. Late Miocene Tidal Deposits in the Amazonian Foreland Basin. *Science* 269, 386-90.
- Rubinoff, D., Cameron, S., Will, K. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for 'barcoding' identification. *The Journal of Heredity* 97(6), 581-94.
- Sala, O. E. 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* 287, 1770-1774.
- Shepard, D.B., Burbrink, F.T. 2009. Phylogeographic and demographic effects of Pleistocene climatic fluctuations in a montane salamander, *Plethodon fourchensis*. *Molecular Ecology* 18, 2243-62.
- Silveira, L.1; Alonso, J.2; Martínez, L. 2006. Efecto de las plantaciones forestales sobre el recurso agua en el Uruguay. *Agrociencia* 10(2), 75 – 93.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10, 407-17.
- Soriano, A., León, R.J.C., Sala, O.E., Lavado, R.S., Deregibus, V.A., Cahuepé, M.A., Scaglia, O.A., Velazquez, C.A., Lemcoff, J.H. 1992. Río de la Plata grasslands. In: *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands.* (Coupland, R.T. ed.) Elsevier, New York, 367-407.
- Soutullo, A., & Gudynas, E. 2005. How effective is the MERCOSUR's network of protected areas in representing South America's ecoregions? *Oryx* 40(1), 112-116.
- Speranza, P.R., Seijo, J.G., Grela, I.A., Neffa, V.G.S. 2007. Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *J. Biogeogr.* 34, 427–436.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690
- StatSoft, Inc. 2005. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com
- 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
- Torres-Pérez, F., Lamborot, M., Boric-Bargetto, D., Hernández, C.E., Ortiz, J.C., Palma, R.E., 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(1), 72-81.
- Vanzolini, P.E. 1968. Geography of the South American Gekkonidae (Sauria). *Arq. Zool. S. Paulo* 17(2), 85-112.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra de Soriano, B., 1961. Um nuevo gekkonidae del Uruguay *Wallsaurus uruguayensis* n.sp. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo* 5(91), 1-11.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra de Soriano, B. 1965. Cola congénita, autotomía y cola regenerada, en *Wallsaurus uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano. *Revista de la Facultad de Humanidades y Ciencias*, 22, 239-256.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra de Soriano, B., 1973. Notas ecológicas sobre *Homonota uruguayensis*. *Bol. Soc. Zool. Uruguay* 2, 53-63.
- Vieira, R.C. 2012. Aspectos Ecológicos de uma População de *Homonota uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Phyllodactylidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- Vieites, D.R., Min, M., Wake, D.B. 2007. Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders. *PNAS* 104(50), 19903-19907.
- Victoriano, P.F., Ortiz, J.C., Benavides, E., Adams, B.J., Sites Jr., J.W., 2008. Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. *Mol. Ecol.* 17, 2397–2416.
- Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen, Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 1-7.
- Xia, X. and Lemey, P. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp. 615-630 in Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme, eds. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. 2nd edition Cambridge University Press.
- Webb, S.D. 1995. Biological Implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. *Science* 269, 361-362.
- Wlasiuk, G., Garza, J.C., Lessa, E.P. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57(4), 913-26.

WWF, 2001. <http://www.worldwildlife.org/science/wildfinder/profiles//nt0710.html> Acesso em janeiro de 2012.

Tabelas

Tabela 1. Localidades amostradas, suas abreviações utilizadas no texto e coordenadas geográficas. BR=Brasil, UY=Uruguai; N=número de indivíduos de *Homonota uruguayensis* amostrados; S=número de sítios polimórficos; h=número de haplótipos; diversidades haplotípicas (Hd) e nucleotídicas (π); testes de neutralidade D de Tajima (D) e Fs de Fu (Fs); *valores significativos ($p < 0.05$).

População	Latitude (S)	Longitude (W)	N	S	h	Hd	π	D*	Fs*
BR - Fazenda Casa Branca (FCB)	-30.2275	-55.1269	10	4	2	0.20 +/- 0.15	0.0007 +/- 0.0006	-1.66706	1.74414
BR - Fazenda São Francisco (FSF)	-29.9783	-55.4164	2	3	2	1.00 +/- 0.50	0.0027 +/- 0.0031	0	1.09861
BR - Cerro do Tigre (CT)	-29.6603	-55.3781	10	7	5	0.71 +/- 0.12	0.0015 +/- 0.0011	-1.38265	0.1949
BR - Alegrete BR290 (BR290)	-29.8458	-55.9208	10	4	3	0.51 +/- 0.16	0.0009 +/- 0.0007	-1.56222	0.3901
BR - Livramento BR293 (BR293)	-30.6081	-55.9536	11	16	6	0.87 +/- 0.07	0.0065 +/- 0.0037	1.23295	1.62789
BR - Cerros Verdes (CV)	-30.7322	-55.5118	10	19	10	1.00 +/- 0.04	0.0051 +/- 0.0030	-0.70044	-5.48774
BR - Cerro do Jarau (CJ)	-30.1947	-56.4883	10	7	4	0.78 +/- 0.09	0.0033 +/- 0.0021	1.88873	2.00905
UY - Artigas 1 (A1)	-30.5919	-56.4119	9	14	7	0.92 +/- 0.09	0.0057 +/- 0.0034	1.10629	-0.77085
UY - Artigas 2 (A2)	-30.6625	-56.6764	8	7	2	0.25 +/- 0.18	0.0016 +/- 0.0012	-1.63982	3.20195
UY - Rivera (RIV)	-31.0943	-55.9650	6	11	3	0.60 +/- 0.21	0.0039 +/- 0.0026	-0.88622	2.58417
UY - Paysandu (PAY)	-31.9043	-56.6539	10	3	5	0.64 +/- 0.15	0.0010 +/- 0.0008	0.09646	-0.69898
UY - Salto (SAL)	-31.3046	-57.2384	10	0	1	0	0.00000	-	-
Todas populações	-	-	106	149	50	0.97 +/- 0.01	0.0262 +/- 0.0128	0.02409	-1.0135

Tabela 2. Fatores de Bayes (log10) calculados para as diferentes estratégias de partição dos genes na análise Bayesiana e para as diferentes topologias de máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (IB), em sequências de *Homonota uruguayensis*.

Modelo de Partição	lnLikelihood	Desvio Padrão	log10 do Fator de Bayes			
			1	2	3	4
1 GTR para os dois genes	-3856.572	+/- 0,09	-	-1.546	-62.75	-72.742
2 12S HKY+I+G e cit b TN93+I+G	-3853.013	+/- 0,096	1.546	-	-61.204	-71.197
3 12S HKY+I+G e cit b TN93+I+G + 2 posições	-3712.085	+/- 0,098	62.75	61.2	-	-9.993
4 12S HKY+I+G e cit b TN93+I+G + 3 posições	-3689.076	+/- 0,088	72.74	71.2	9.993	-
Modelo de Topologia						
1 Cerro do Tigre basal (IB)	-3689.076	+/- 0,087	-	15.7	-	-
2 Artigas basal (ML)	-3725.215	+/- 0,102	-15.7	-	-	-

Tabela 3. Valores de divergência intrapopulacional (diagonal em negrito), distâncias não corrigidas entre as populações de e também grupos externos (abaixo da diagonal) e valores de Φ_{ST} (acima da diagonal).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 Cerro Jarau	0.003	0.480	0.873	0.849	0.939	0.688	0.581	0.781	0.869	0.925	0.954	-	-
2 Livram BR293	0.008	0.007	0.798	0.513	0.897	0.243	0.528	0.692	0.799	0.874	0.911	-	-
3 Rosario	0.021	0.022	0.005	0.936	0.957	0.841	0.837	0.924	0.917	0.953	0.972	-	-
4 Alegrete BR290	0.013	0.009	0.025	0.002	0.971	0.514	0.796	0.934	0.937	0.969	0.990	-	-
5 Cerro do Tigre	0.038	0.039	0.042	0.042	0.003	0.920	0.905	0.961	0.945	0.970	0.986	-	-
6 Cerros Verdes	0.013	0.008	0.023	0.006	0.040	0.004	0.667	0.800	0.847	0.909	0.938	-	-
7 Artigas1	0.010	0.012	0.026	0.017	0.040	0.017	0.006	0.438	0.833	0.898	0.926	-	-
8 Artigas2	0.013	0.014	0.027	0.020	0.040	0.019	0.009	0.006	0.921	0.961	0.983	-	-
9 Rivera	0.026	0.027	0.033	0.031	0.044	0.030	0.032	0.034	0.006	0.889	0.947	-	-
10 Paysandu	0.029	0.030	0.035	0.034	0.047	0.033	0.035	0.038	0.020	0.002	0.978	-	-
11 Salto	0.035	0.037	0.039	0.042	0.054	0.040	0.041	0.042	0.027	0.029	-	-	-
12 H. fasciata	0.164	0.166	0.168	0.169	0.174	0.167	0.162	0.161	0.173	0.169	0.171	-	-
13 H. borelli	0.106	0.109	0.113	0.109	0.115	0.111	0.108	0.107	0.112	0.113	0.120	0.170	-

Tabela 4. Valores de theta e de crescimento com seus respectivos intervalos de confiança (IC95%), e o número efetivo médio de cada população de *Homonota uruguayensis* calculados no programa LAMARC.

População	Theta	IC 95%	Nef médio	Crescimento	IC 95%
Art1	0.007264	0.0022 - 0.0312	126.000	141.6904	-471.736 - 895.4223
Art2	0.001114	0.000222 - 0.005605	19.800	-402.7511	-2911.84 - 1333.212
BR290	0.000662	9.34e-005 - 0.005545	11.500	-557.4656	-5000.00 - 10000.0
CJ	0.001629	0.000392 - 0.006762	28.300	-179.8209	-2090.81 - 1547.737
BR293	0.004487	0.001510 - 0.015172	78.100	7.98721	-685.93 - 675.7446
CT	0.002065	0.000486 - 0.408065	36.000	6.03956	-1814.50 - 3535.233
CV	0.035799	0.006575 - 0.643975	623.000	1355.87	206.91 - 7599.703
SAL	0.00000012	3.02e-008 - 3.77e-007	19	7069.882	<-5000.00 - 7069.882
PAY	0.00223	0.000393 - 0.310976	38.800	575.4661	-2460.77 - 23513.36
FCB	0.004351	0.001125 - 0.074782	75.700	371.4769	-985.42 - 4618.553
RIV	0.005011	0.001029 - 0.055998	87.100	166.0496	-1042.10 - 1916.088

Figuras

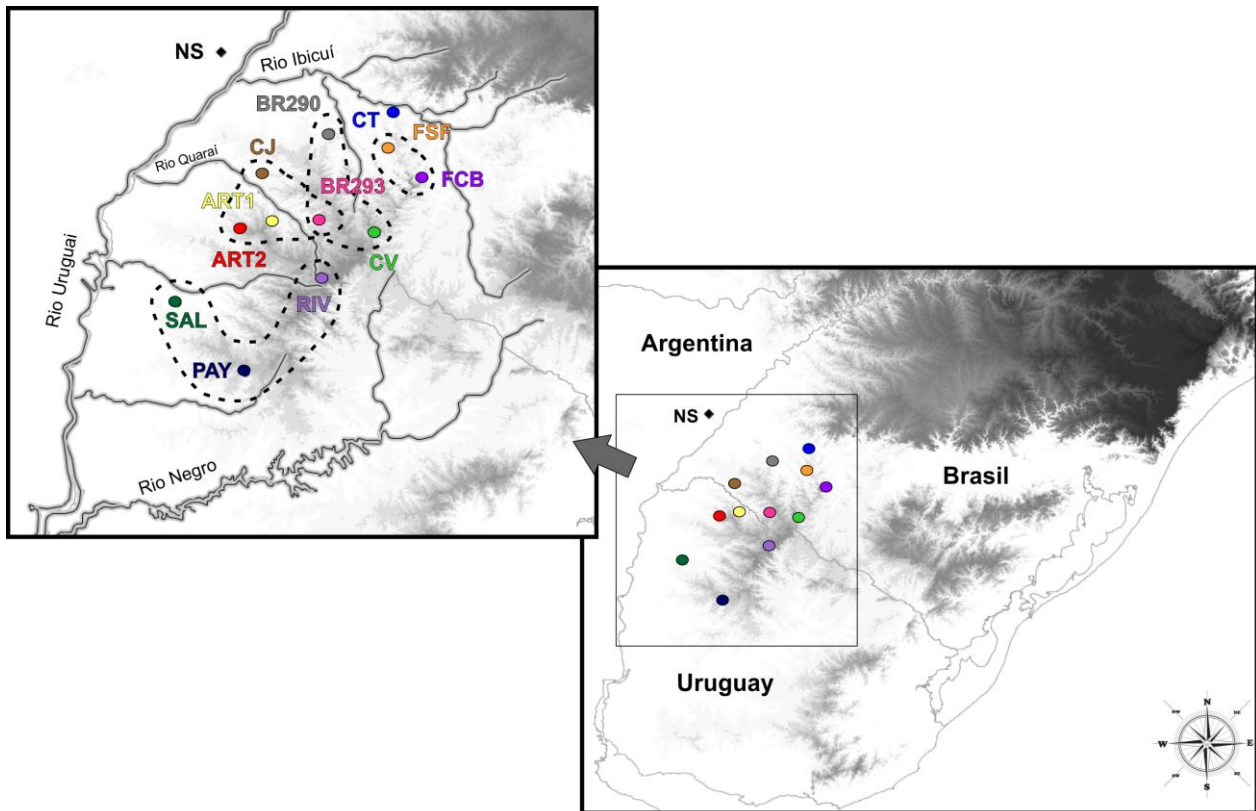


Figura 1. Mapa mostrando as localidades no Brasil (estado do Rio Grande do Sul) e no Uruguai (à direita) onde foram coletadas amostras de *Homonota uruguayensis*. Na figura à esquerda, aproximação da área de ocorrência detalhando os nomes das localidades, os principais rios da região, e os agrupamentos inferidos pela árvore bayesiana (linha pontilhada). Ponto NS= localização da provável nova espécie de *Homonota*. Área de maior altitude na região amostrada da figura à esquerda corresponde à formação Coxilha de Haedo.

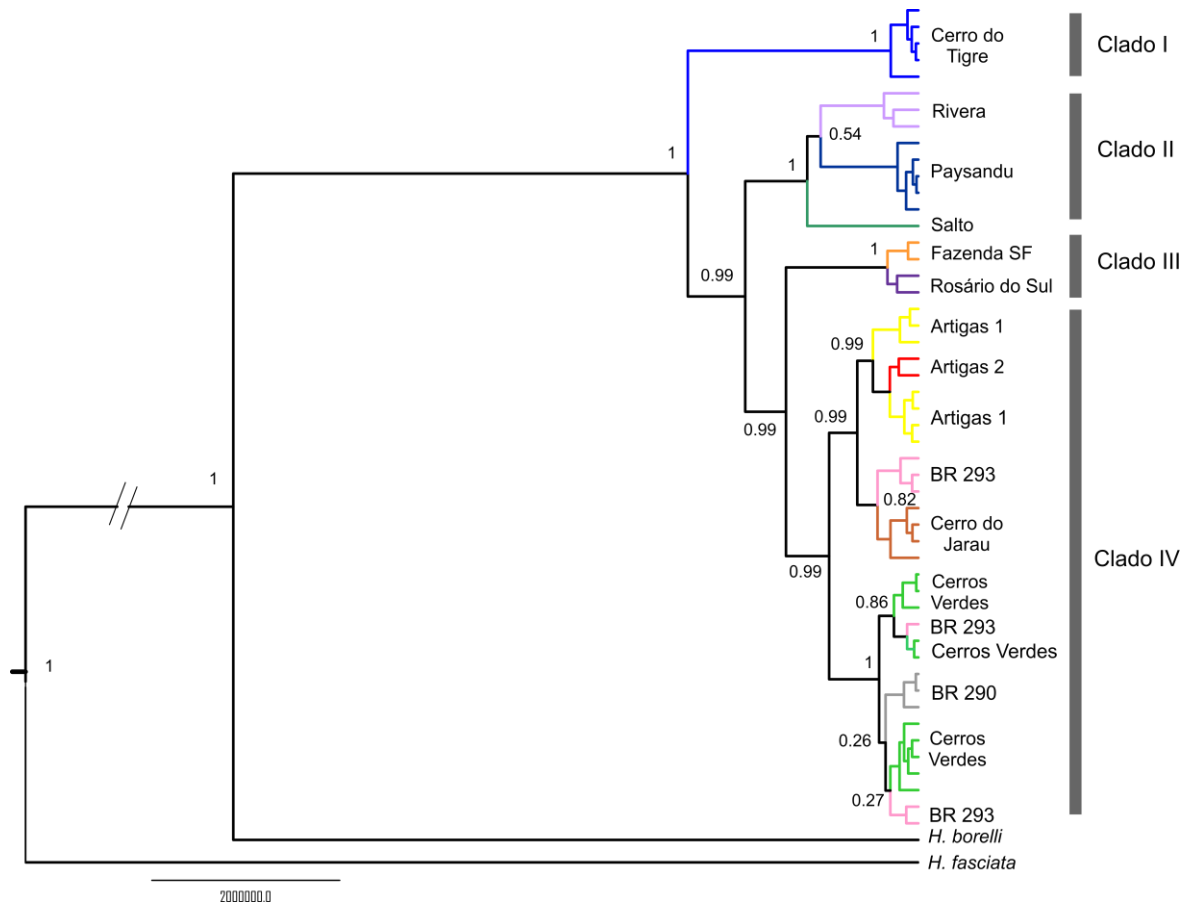


Figura 2. Árvore de inferência Bayesiana gerada no programa BEAST 1.6.2 a partir de seqüências de *Homonota uruguayensis* e grupos externos. Os ramos foram coloridos segundo as cores das localidades (ver Figura 1). Valores de probabilidade posterior adjacentes aos nós.

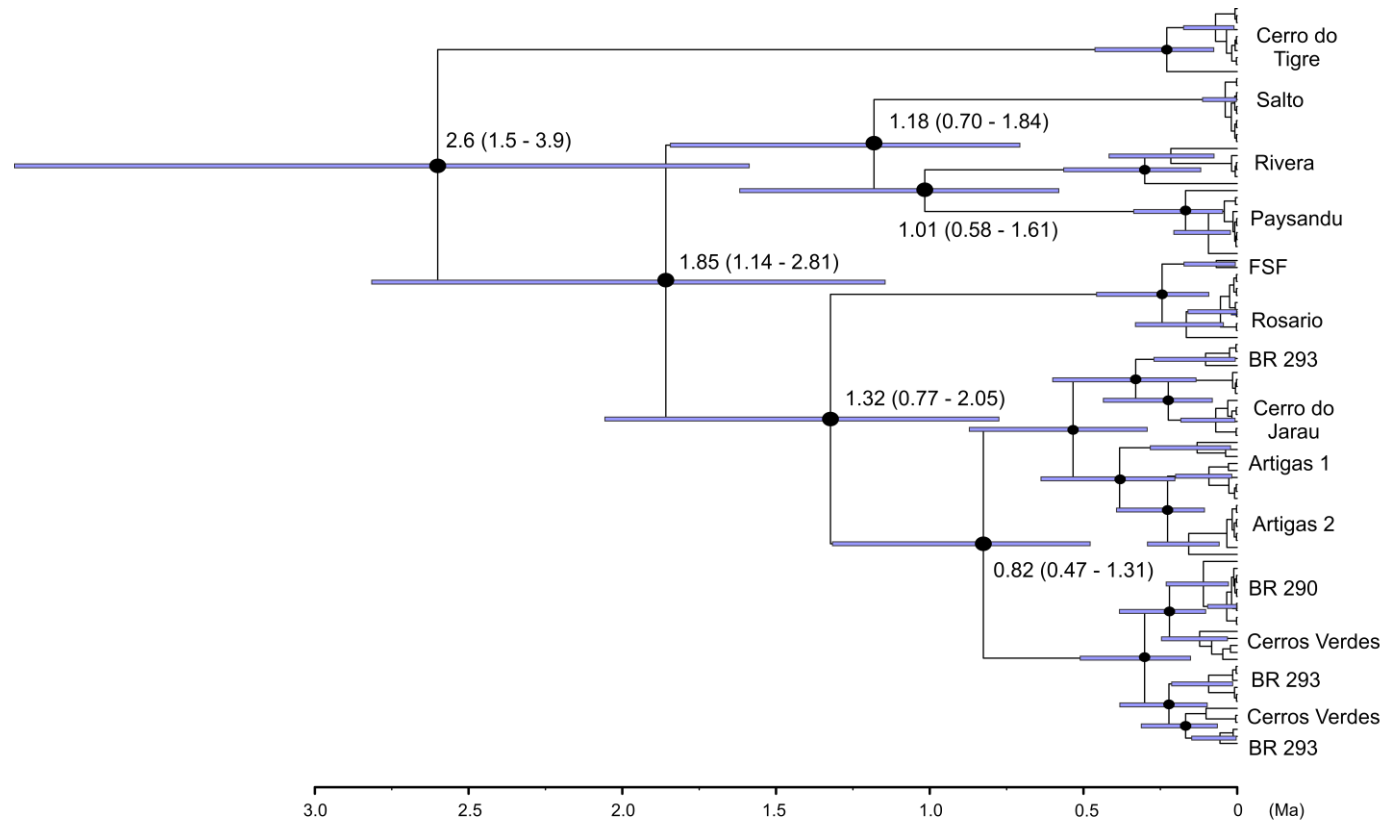


Figura 3. Datação das divergências entre as linhagens de *Homonota uruguayensis* resultante da análise de Bayesian Skyline Plot. Os principais nós que separam os grandes grupos apresentam os valores médios e do intervalo de confiança. Barras azuis representam a extensão dos intervalos de confiança. Escala com valores em milhões de anos (Ma).

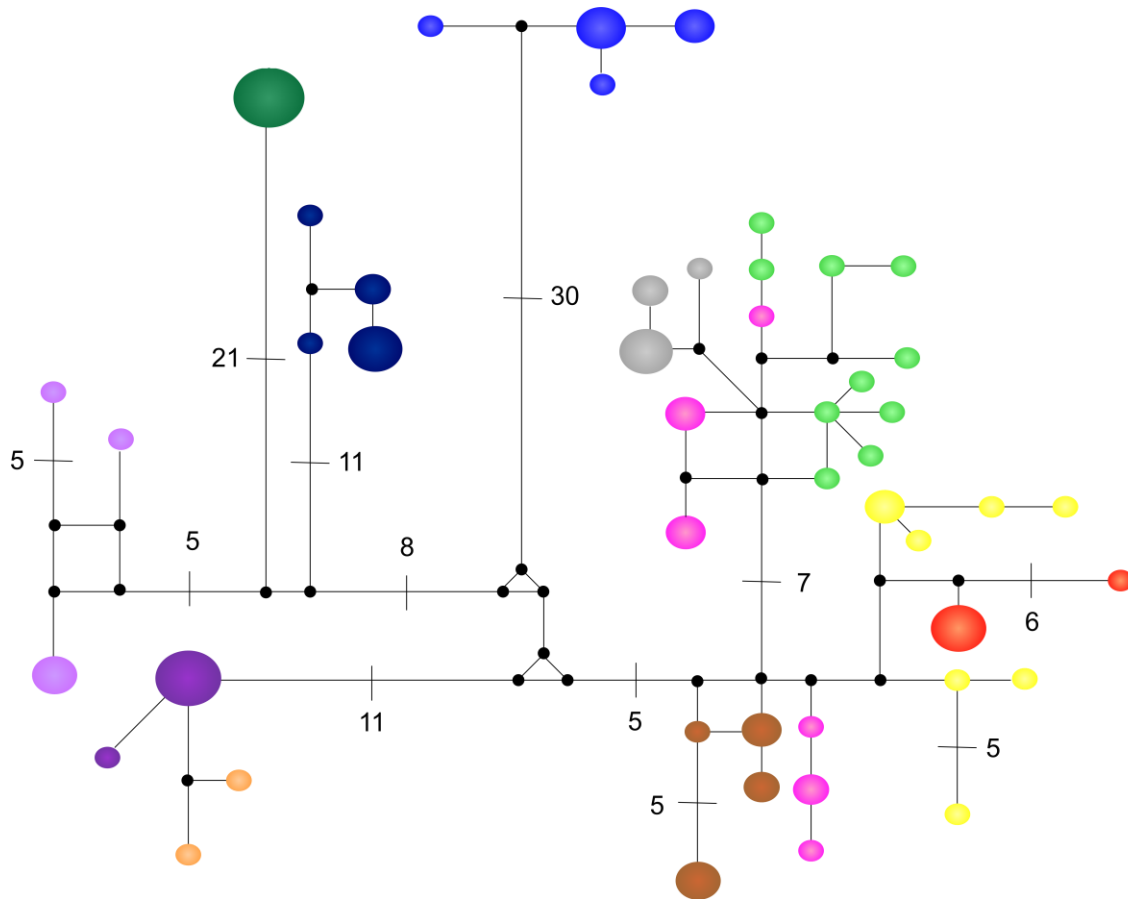


Figura 4. Rede de haplótipos dos genes concatenados (*cytb* e 12S) de *Homonota uruguayensis*. Cores das esferas representando cada localidade de acordo com a Figura 1. Tamanhos das esferas e ramos proporcionais ao número de indivíduos de cada haplótipo e número de mutações, respectivamente. Pontos em preto representando os vetores médios.

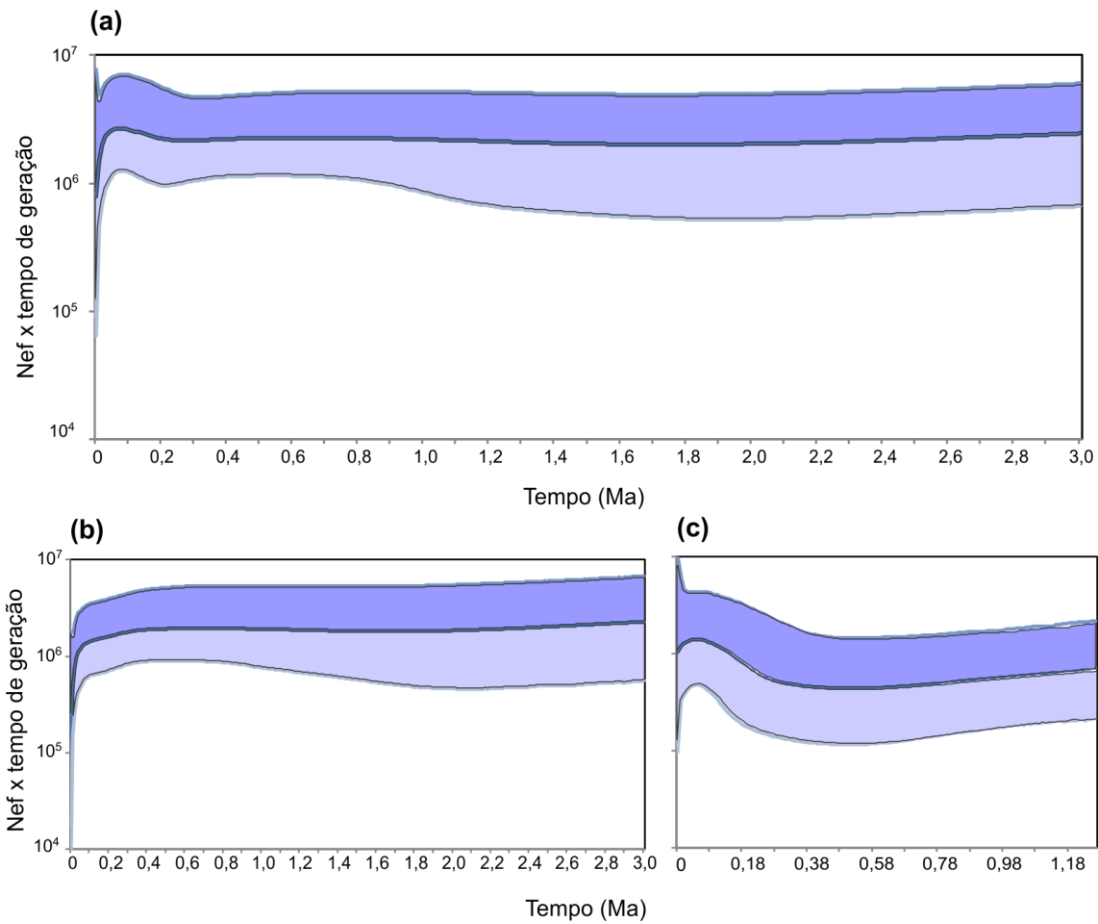


Figura 5. Bayesian Skyline Plot mostrando a variação do tamanho populacional de *Homonota uruguayensis* (N_{ef} x tempo de geração) pelo tempo para (a) espécie; (b) CT, clado II e III; (c) populações centrais (clado IV). Linha central escura representando a mediana, e em tons de azul os intervalos de confiança. Figuras b e c possuem a mesma escala Y.

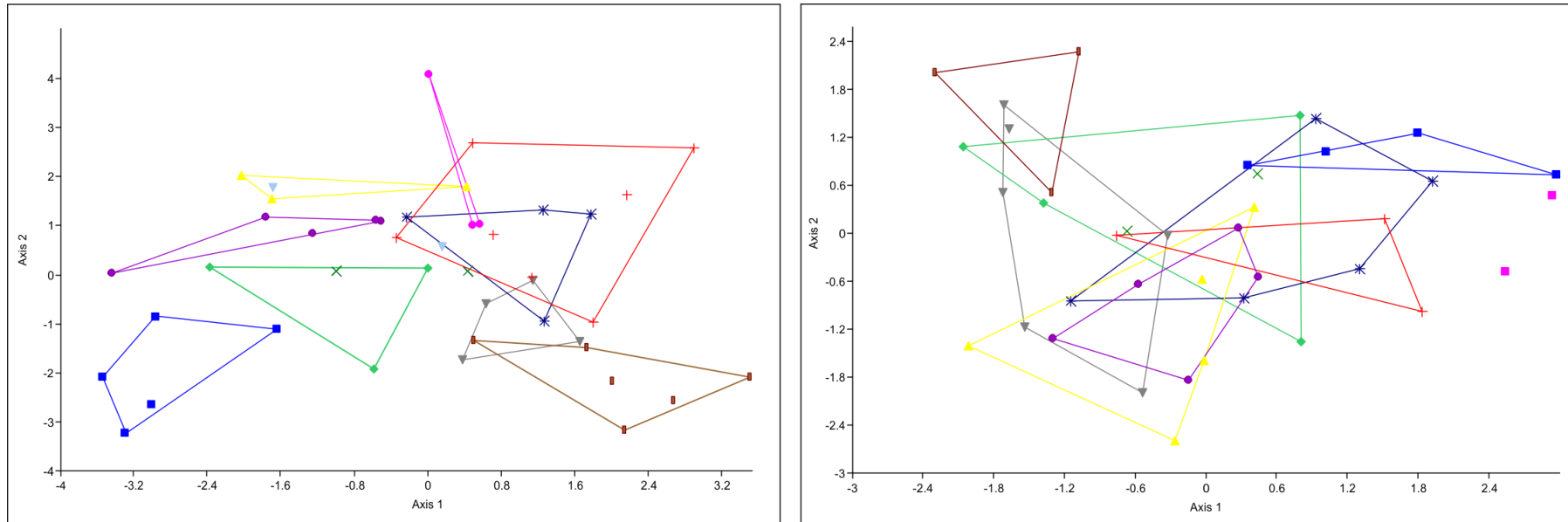


Figura 6. Gráficos de dispersão gerados pela Análise de Variância Canônica (CVA) para fêmeas (à esquerda) e machos (à direita) de *Homonota uruguayensis*, os dois eixos correspondem a 82,3% e 76,6% da variação, respectivamente. As cores seguem o padrão de coloração das localidades (Figura 1 e 4).

Material Suplementar

Tabela 1. Médias e desvios padrões das variáveis morfométricas de *Homonota uruguayensis* para cada localidade. Abreviações descritas no texto. Valores dados em milímetros, separados por sexo, e número de indivíduos indicados entre parênteses.

	ART1		ART2		BR290		BR293		CJ	
	M (N=5)	F (N=3)	M (N=3)	F (N=7)	M (N=6)	F (N=4)	M (N=2)	F (N=3)	M (N=3)	F (N=6)
CRC	40,75 ± 2,21	40,14 ± 1,56	41,58 ± 2,63	39,40 ± 2,93	41,40 ± 1,47	40,49 ± 1,52	39,94 ± 2,03	40,79 ± 1,38	42,93 ± 1,50	40,29 ± 1,84
CCab	11,54 ± 0,50	10,98 ± 0,17	12,31 ± 1,07	11,12 ± 0,53	11,68 ± 1,01	11,4 ± 0,48	12,84 ± 0,44	11,48 ± 0,70	11,98 ± 0,73	11,21 ± 0,40
LCab	7,87 ± 0,25	7,77 ± 0,12	8,03 ± 0,41	7,64 ± 0,57	8,26 ± 0,34	7,85 ± 0,50	7,95 ± 0,42	7,73 ± 0,10	8,44 ± 0,32	7,89 ± 0,32
CPes	2,04 ± 0,67	2,35 ± 0,25	2,31 ± 0,12	2,43 ± 0,60	2,79 ± 0,80	3,61 ± 0,41	2,06 ± 0,82	2,38 ± 0,78	3,91 ± 0,74	4,05 ± 0,48
LPes	6,82 ± 0,55	7,65 ± 0,67	7,20 ± 0,67	7,17 ± 0,76	6,88 ± 0,63	7,73 ± 0,45	7,0 ± 0,23	7,82 ± 0,71	7,25 ± 0,08	7,21 ± 0,46
CFoc	3,68 ± 0,17	3,70 ± 0,1	3,65 ± 0,17	3,43 ± 0,29	3,75 ± 0,17	3,57 ± 0,13	3,66 ± 0,20	3,67 ± 0,23	3,95 ± 0,08	3,68 ± 0,08
LCau	4,53 ± 0,38	4,49 ± 0,16	4,11 ± 0,40	4,20 ± 0,49	4,54 ± 0,43	4,64 ± 0,68	4,38 ± 0,19	4,47 ± 0,20	4,77 ± 0,27	4,31 ± 0,28
CAX-vir	17,34 ± 0,77	18,25 ± 0,90	18,56 ± 2,08	17,61 ± 1,75	17,03 ± 0,77	16,51 ± 1,41	17,31 ± 1,21	18,06 ± 0,61	18,25 ± 0,97	17,78 ± 0,85
CBr	3,04 ± 0,68	3,62 ± 0,20	3,35 ± 0,32	2,86 ± 0,20	3,25 ± 0,44	3,24 ± 0,56	2,82 ± 0,27	2,71 ± 0,08	3,38 ± 0,02	3,03 ± 0,43
CAnt-br	4,15 ± 0,19	4,08 ± 0,39	4,20 ± 0,29	3,79 ± 0,16	4,11 ± 0,37	4,18 ± 0,41	3,93 ± 0,20	3,98 ± 0,21	4,36 ± 0,11	4,25 ± 0,27
CTibia	4,14 ± 0,33	4,04 ± 0,51	4,25 ± 0,30	3,81 ± 0,43	4,0 ± 0,30	4,05 ± 0,19	4,04 ± 0,20	4,15 ± 0,33	4,48 ± 0,65	4,41 ± 0,53
CFemur	5,39 ± 0,27	5,59 ± 0,10	5,57 ± 0,45	5,36 ± 0,58	5,15 ± 0,33	5,09 ± 0,05	5,41 ± 1,02	5,10 ± 0,38	5,53 ± 0,38	5,05 ± 0,50
C3ant	3,50 ± 0,32	3,25 ± 0,17	3,35 ± 0,33	3,19 ± 0,32	3,44 ± 0,23	3,32 ± 0,15	3,17 ± 0,01	3,32 ± 0,23	3,67 ± 0,11	3,53 ± 0,23
C3pos	4,20 ± 0,41	4,16 ± 0,37	4,46 ± 0,12	3,86 ± 0,41	4,33 ± 0,21	4,25 ± 0,15	4,16 ± 0,39	4,11 ± 0,34	4,69 ± 0,04	4,22 ± 0,22
C4ant	3,59 ± 0,40	3,43 ± 0,20	3,47 ± 0,43	3,15 ± 0,28	3,60 ± 0,22	3,40 ± 0,19	3,34 ± 0,50	3,43 ± 0,03	3,76 ± 0,34	3,58 ± 0,04
C4pos	4,79 ± 0,52	4,57 ± 0,36	4,77 ± 0,05	4,24 ± 0,51	4,83 ± 0,29	4,68 ± 0,28	4,67 ± 0,13	4,89 ± 0,56	5,27 ± 0,07	4,73 ± 0,56

Tabela 1. Continuação.

CT		CV		FCB		PAY		RIV		SAL	
M (N=4)	F (N=5)	M (N=4)	F (N=3)	M (N=5)	F (N=5)	M (N=5)	F (N=4)	M (N=1)	F (N=2)	M (N=2)	F (N=2)
44,03 ± 1,95	41,23 ± 4,20	38,97 ± 0,18	40,95 ± 0,91	42,35 ± 2,17	40,50 ± 2,17	39,34 ± 1,25	40,06 ± 1,91	40,43	39,1 ± 2,59	40,95 ± 2,32	42,17 ± 4,09
12,82 ± 0,79	12,02 ± 0,82	11,04 ± 0,18	11,99 ± 0,91	12,33 ± 0,86	11,62 ± 0,45	11,12 ± 0,64	11,22 ± 0,86	10,97	10,47 ± 1,24	11,54 ± 0,32	11,26 ± 0,18
8,49 ± 0,38	8,28 ± 0,74	7,57 ± 0,16	7,84 ± 0,10	8,57 ± 0,63	8,03 ± 0,37	7,69 ± 0,55	7,54 ± 0,39	7,71	7,68 ± 0,92	8,49 ± 0,28	8,49 ± 0,95
3,28 ± 0,50	3,72 ± 0,71	2,68 ± 0,71	2,92 ± 0,58	2,22 ± 0,33	2,85 ± 0,32	2,44 ± 0,29	2,53 ± 0,44	2,56	2,38 ± 0,16	2,59 ± 0,17	3,36 ± 0,71
6,96 ± 0,75	7,04 ± 1,31	5,96 ± 0,70	6,96 ± 0,92	7,60 ± 0,60	7,90 ± 0,57	6,60 ± 0,92	7,16 ± 0,87	6,28	7,22 ± 1,02	7,28 ± 0,51	8,23 ± 1,21
4,52 ± 0,17	4,28 ± 0,44	3,49 ± 0,10	3,88 ± 0,18	4,02 ± 0,26	3,85 ± 0,18	3,73 ± 0,24	3,58 ± 0,12	3,55	3,65 ± 0,43	3,59 ± 0,04	3,88 ± 0,41
5,09 ± 0,27	4,31 ± 0,28	4,40 ± 0,40	4,47 ± 0,07	4,77 ± 0,39	4,48 ± 0,32	4,32 ± 0,37	4,32 ± 0,35	4,63	4,23 ± 0,69	4,63 ± 0,16	5,05 ± 0,68
18,41 ± 0,87	16,95 ± 2,52	17,19 ± 1,05	17,26 ± 0,62	18,32 ± 1,25	17,56 ± 1,53	16,73 ± 1,35	18,08 ± 1,34	18,15	17,69 ± 1,28	17,30 ± 1,02	17,54 ± 2,69
3,51 ± 0,58	3,72 ± 0,66	3,11 ± 0,26	3,19 ± 0,40	2,94 ± 0,43	3,63 ± 0,33	2,86 ± 0,43	2,86 ± 0,33	3,22	3,38 ± 0,10	2,87 ± 0,59	3,31 ± 1,14
4,85 ± 0,25	4,53 ± 0,55	4,06 ± 0,08	4,12 ± 0,08	4,14 ± 0,22	4,24 ± 0,42	3,77 ± 0,22	3,78 ± 0,15	3,84	4,08 ± 0,05	4,37 ± 0,17	4,41 ± 0,34
5,43 ± 0,47	4,93 ± 0,47	3,87 ± 0,40	4,02 ± 0,29	4,08 ± 0,27	4,36 ± 0,17	3,94 ± 0,34	3,95 ± 0,40	4,43	3,93 ± 0,46	4,50 ± 0,13	4,64 ± 0,71
6,64 ± 0,38	5,75 ± 0,71	5,07 ± 0,35	5,48 ± 0,36	5,31 ± 0,47	5,45 ± 0,42	5,60 ± 0,51	5,20 ± 0,37	5,51	5,21 ± 0,42	5,86 ± 0,15	5,45 ± 0,98
3,75 ± 0,38	3,66 ± 0,22	3,44 ± 0,51	3,49 ± 0,24	3,31 ± 0,44	3,49 ± 0,37	3,41 ± 0,06	3,22 ± 0,26	3,0	3,32 ± 0,11	3,78 ± 0,02	3,66 ± 0,47
4,9 ± 0,35	4,72 ± 0,49	4,39 ± 0,49	4,37 ± 0,05	4,32 ± 0,30	4,0 ± 0,27	4,07 ± 0,26	4,03 ± 0,19	4,05	4,16 ± 0,14	4,95 ± 0,05	4,53 ± 0,33
4,03 ± 0,25	3,89 ± 0,24	3,50 ± 0,53	3,59 ± 0,37	3,32 ± 0,49	3,56 ± 0,24	3,43 ± 0,11	3,39 ± 0,39	3,02	3,34 ± 0,05	3,78 ± 0,36	3,73 ± 0,40
5,21 ± 0,48	4,89 ± 0,53	4,56 ± 0,46	4,85 ± 0,36	4,83 ± 0,23	4,64 ± 0,36	4,48 ± 0,33	4,41 ± 0,24	4,93	4,23 ± 0,67	5,11 ± 0,08	4,96 ± 0,20

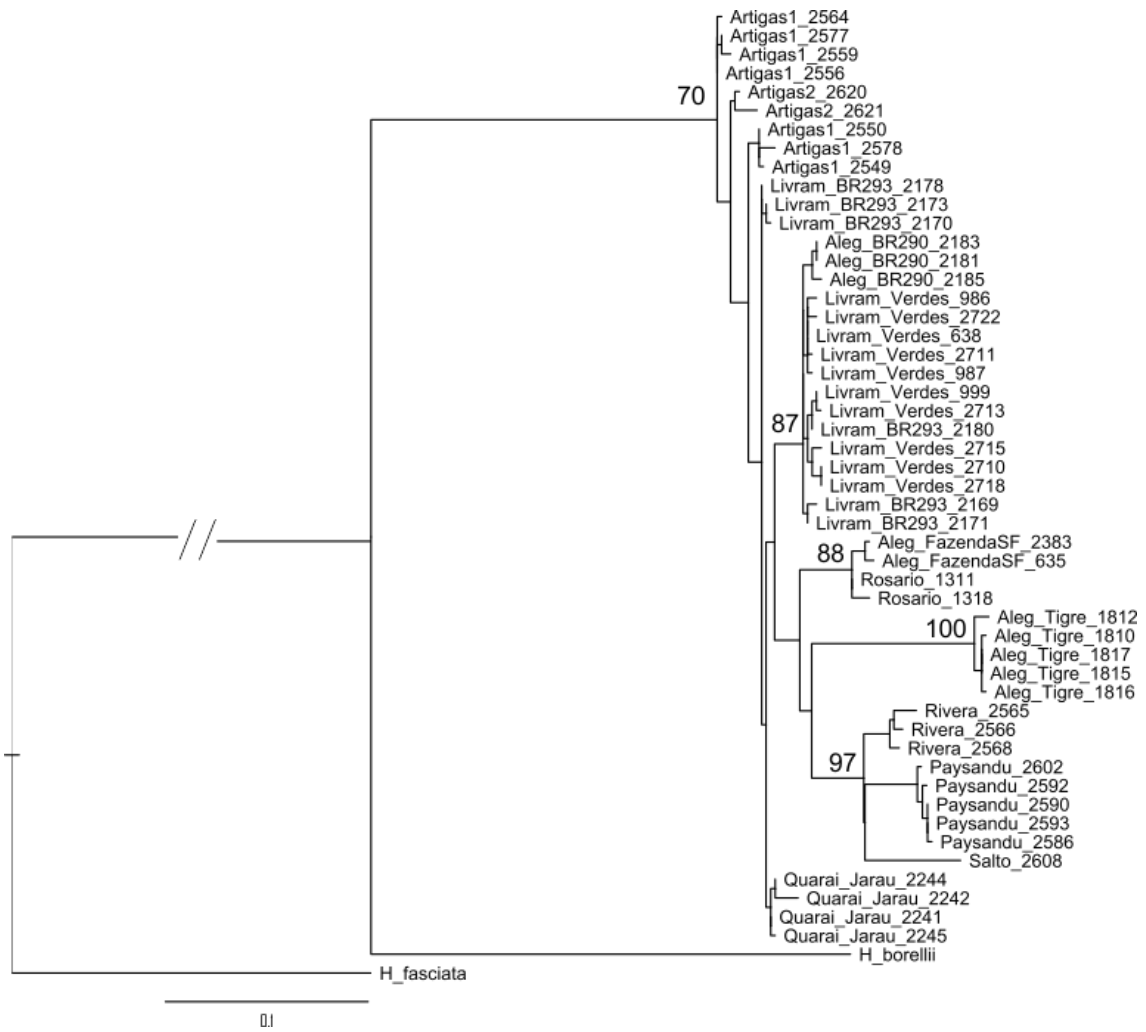


Figura 1. Árvore de máxima-verossimilhança gerada no programa RAxML 7.0.3. a partir de sequências de *Homonota uruguayensis*. Valores de suporte abaixo de 70 foram omitidos.

Anexo 1. Modelagem de distribuição geográfica de *Homonota uruguayensis*

Justificativa

A modelagem foi realizada inicialmente a fim de compreendermos melhor como se dá a distribuição atual de *Homonota uruguayensis* e onde se localizam áreas com potencial de ocorrência. A partir disso, verificamos a eficiência das nossas coletas em abranger o máximo possível da extensão da área de ocorrência da espécie, e também em procurar populações em áreas potenciais indicadas pela análise.

Material e Métodos

A base de dados foi composta por coordenadas geográficas das localidades de coleta do presente trabalho. Optamos por não aumentar o número de localidades incluindo pontos citados na literatura a fim de evitar possíveis erros de registro.

Para gerar o modelo foram utilizadas 19 variáveis bioclimáticas derivadas de médias mensais de temperatura e precipitação entre 1950-2000, e uma variável de altitude. As variáveis ambientais utilizadas foram retiradas do projeto Worldclim (www.worldclim.org) com uma resolução de 30 Arc segundos (cerca de 0,86 km² por pixel). As camadas utilizadas foram: BIO01, Temperatura Média Anual; BIO02, Média Diurna Mensal (temp. max - temp. min); BIO03, Isotermalidade; BIO04, Temperatura Sazonal; BIO05, Temperatura Máxima do Mês mais Quente; BIO06, Temperatura Mínima do Mês mais Frio; BIO07, Variação Anual de Temperatura; BIO08, Média de Temperatura do Trimestre mais úmido; BIO09, Média de Temperatura do Trimestre mais seco; BIO10, Média da Temperatura do Mês mais Quente; BIO11; Média da Temperatura do Mês mais Frio; BIO12, Precipitação Anual; BIO13, Precipitação do Mês mais Úmido; BIO14, Precipitação do Mês mais Seco; BIO15, Precipitação Sazonal (Coeficiente de Variação); BIO16, Precipitação do Trimestre mais Úmido; BIO17, Precipitação do Trimestre mais Seco; BIO18, Precipitação do Trimestre mais Quente; BIO19, Precipitação do Trimestre mais Frio; ALT, Altitude (elevação Acima do

Nível do Mar, em metros). Todas as variáveis foram processadas no software IDRISI-Andes (www.clarklabs.org) e dimensionadas de acordo com as áreas de interesse.

Os modelos foram gerados empregando-se o software MAXENT versão 3.3.3a (Phillips et al., 2006), que utiliza um algoritmo baseado no conceito de máxima entropia. Adotamos como medida indicadora da qualidade do modelo o valor de AUC (área abaixo da curva), sendo 0,5 considerado um modelo aleatório, e de 0,9 a 1 um modelo ótimo.

A partir do mapa resultante, plotamos sobre ele as coordenadas geográficas das localidades onde as saídas a campo realizadas não tiveram sucesso em encontrar *H. uruguayensis* para verificar se amostramos áreas de ocorrência potencial.

Resultados e discussão

O modelo gerado resultou em um valor considerado ótimo (AUC= 0,993). As cinco variáveis mais importantes para o modelo foram Temperatura Sazonal (BIO4), Precipitação Sazonal (BIO15), altitude, Precipitação do Mês mais Seco (BIO14) e Precipitação do Trimestre mais Quente (BIO18).

A distribuição de *Homonota uruguayensis* mostrou-se muito associada à elevação correspondente à Coxilha de Haedo (porção em tons avermelhados na Figura 1). Conseguimos verificar que amostramos, sem sucesso de registro da espécie, regiões ao norte do Ibicuí (representadas por duas localidades) onde há probabilidade de ocorrência. Tendo em vista que a espécie é facilmente observada e capturada onde ocorre, em qualquer época do ano, a hipótese do Rio Ibicuí atuando como barreira de distribuição da espécie é reforçada.

Também como contribuição para o conhecimento da distribuição da espécie, sugerimos que o registro da literatura no Departamento de Cerro Largo seja considerado um erro já que uma extensa busca foi realizada na região sem sucesso. É importante frisar que nessa região os afloramentos rochosos não são semelhantes aos normalmente habitados pela espécie, sendo compostos por rochas graníticas, o que torna ainda mais esse registro suscetível a ser um erro.

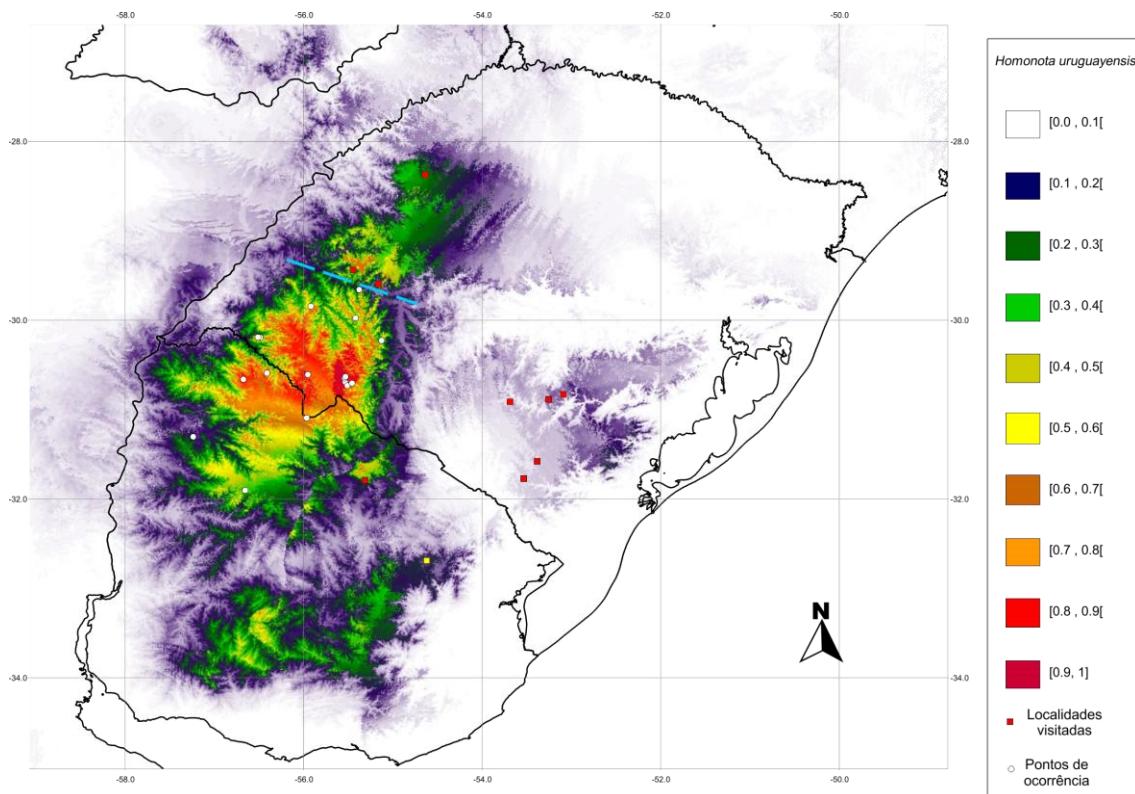


Figura 1. Modelo de distribuição geográfica de *Homonota uruguayensis* (AUC= 0,993). As cores da legenda refletem a probabilidade de ocorrência da espécie. Círculos brancos representam localidades amostradas no presente estudo, quadrados vermelhos locais onde não foi registrada a espécie, e quadrado amarelo corresponde ao ponto da literatura onde não houve a confirmação da espécie. Linha pontilhada azul marca a localização do Rio Ibicuí.

Conclusões gerais

As populações de *Homonota uruguayensis* apresentam uma forte estruturação em grupos geograficamente distintos

O padrão encontrado sugere uma interrupção no fluxo gênico entre as populações ocorrida a longo prazo, e assim, cada localidade seguiu evoluindo independentemente em isolamento geográfico.

A alta especificidade de habitat e a limitada dispersão que a espécie apresenta aliada a distância entre as localidades são os fatores que mais contribuem para o isolamento dos afloramentos.

A estruturação encontrada entre as populações de *H. uruguayensis* é corroborada pelas análises genéticas, morfológicas e pelos dados ecológicos.

Devido às características debatidas nesse trabalho, consideramos que a espécie deva ter seu *status* de conservação reavaliado.

Esse estudo contribui com o conhecimento da história evolutiva na Savana Uruguaia e abre uma perspectiva para mais estudos na região.

Normas de formatação Molecular Phylogenetics and Evolution

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Molecular Phylogenetics and Evolution is dedicated to bringing Darwin's dream within grasp – to "have fairly true genealogical trees of each great kingdom of Nature." The journal provides a forum for molecular studies that advance our understanding of phylogeny and evolution, further the development of phylogenetically more accurate taxonomic classifications, and ultimately bring a unified classification for all the ramifying lines of life. Phylogeographic studies will be considered for publication if they offer EXCEPTIONAL theoretical or empirical advances.

The journal encourages articles that are multidisciplinary, especially in areas, such as bioinformatics, computational biology, molecular biology, and organismic biology, that are of interest to the community of systematic and evolutionary biologists. In addition, presentations of new findings on or insights into evolutionary processes and mechanisms as expressed at the molecular level are welcome, as are those that deal with the methodology of reconstructing evolutionary history from molecular data (such as descriptions of new or more powerful computer algorithms for constructing phylogenetic trees from orthologous nucleotide or aminoacid sequences). A deeper understanding of the mechanisms and processes of molecular evolution should lead to more accurate models of molecular evolution, which in turn should facilitate the development of better algorithms for reconstructing evolutionary history from sequence data.

Papers based on few taxa, single molecular markers, or that use codon-based methods to test for positive Darwinian selection, but in the absence of experimental evidence that allegedly selected amino acid changes cause an adaptive phenotypic effect, will not be accepted.

In addition to regular articles, Review papers are also accepted. Review papers do not necessarily contain new data; rather, they are a status report of a specific field within molecular phylogenetics. There are no page limits to regular articles or Review papers.

Authors should relate molecular phylogeny to a broader audience by linking taxonomic group/names to common names so papers will have more general appeal.

Short communications of approximately 3000 words are also accepted. These papers should contain no more than two figures, two tables, and thirty references. A short abstract of fewer than 200 words is acceptable.

Letters to the editor should consist of about 1000 words and contain no tables, no figures, and no new data. Manuscripts should be prepared according to the following style rules. Deviation from these rules causes publication delays.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is

not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Additional information

Preparation of supplementary material

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of the article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that submitted material is directly usable, please provide data in one of our recommended file formats. Submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions, please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: Database ID: xxxx Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.