

UCH-FC
Doc - EBE
S162
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Filogenia y patrón filogeográfico de *Bothrops asper*
(Serpentes, Viperidae) : Estudio de la variación molecular
y morfológica**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con
Mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

por

Mónica María Saldarriaga Córdoba

Julio, 2009

Director de Tesis: Dr. Marco Méndez T

Co-Director: Dr. Mahmood Sasa Marín



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

MÓNICA MARÍA SALDARRIAGA CÓRDOBA

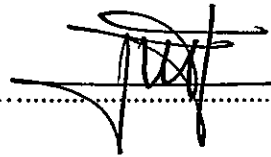
Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de abril del 2009.

Director de Tesis:

Dr. Marco Méndez T.

Co-Director de Tesis:

Dr. Mahmood Sasa M..



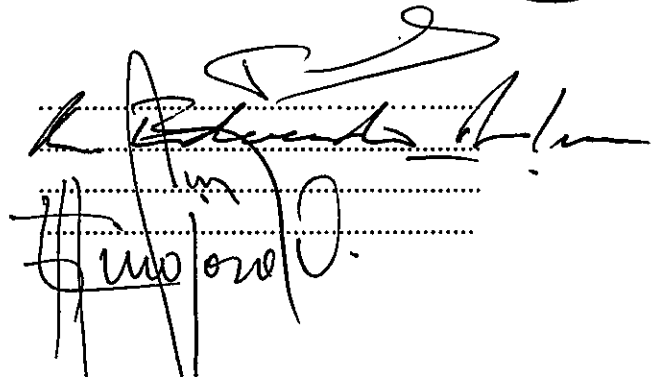
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Elie Poulin

Dr. Eduardo Palma

Dr. Rodrigo Medel

Dr. Felipe Hinojosa



RESEÑA



Mi nombre es Mónica María Saldarriaga Córdoba, nací un 8 de agosto de 1970, en la "ciudad de la eterna primavera", Medellín Colombia. Desde niña crecí con libertad en medio de los Valles y Montañas de mi Vereda El Zarzal, en la finca de mis abuelos, junto con mis padres, Luz Marina y Darío y mi hermano, Luis Gabriel. Desde pequeña crecí rodeada de animales domésticos pero mi verdadera fascinación era hacia la fauna silvestre especialmente los animales ponzoñosos. Mi habitación fue el hábitat de ofidios y artrópodos durante el tiempo que estuve en ella. Siempre me pregunté, ¿por qué no estudié Biología?, porque cuando quise ingresar a la Universidad opté por Medicina Veterinaria en el año 1989. Durante el segundo semestre de mi carrera me integré al Serpentario de la Universidad de Antioquia, dirigido por el Dr. Rafael Otero Patiño. Desde ese momento empezó mi fascinante viaje por el mundo de las toxinas. Inicialmente colaboraba en la alimentación de las serpientes, ingreso de animales, limpieza de jaulas y extensión a la comunidad; luego fui nombrada monitora y fue en esta etapa, en la que me incorporé al equipo de ordeño, conformado por Oscar Rojas, mi amigo por siempre aunque ya no esté presente en esta tierra y Jhon Jairo Arboleda. Con ellos, aprendí la técnica de manipular Cascabeles, Verrugosos y Terciopelos. Además, me enseñaron a no perderles nunca el respeto aunque no les tuviera miedo. Después de graduarme como Médica Veterinaria en 1995, me integré como Co-investigadora del grupo en el manejo de colecciones vivas de reptiles y artrópodos y participé activamente en investigaciones sobre Morbi-Mortalidad por enfermedades infecciosas en serpientes venenosas. En el año 2000, obtuve mi maestría en Inmunotoxinología, durante la cual investigué sobre los aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno de serpiente, la variabilidad ontogénica y geográfica del veneno de *Bothrops asper* y *B. atrox*, así como también participé en estudios clínicos e investigaciones sobre el uso de alternativas terapéuticas en el tratamiento del accidente ofídico y escorpiónico. Finalmente, en el año 2003 fui la Coordinadora del grupo de investigación. Durante septiembre del mismo año, decidí postular al doctorado en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva que imparte la Universidad de Chile. Aunque en Chile no es prioridad el estudio sobre animales venenosos, este doctorado me permitió ingresar al mundo de la Biología y Ecología, adquirir bases científicas en esta área que para mí era desconocida hasta ese momento, y además, este programa junto con CONICYT me permitieron hacer realidad mi sueño de contribuir en el conocimiento desde el punto de vista molecular y evolutivo de "La Terciopelo". Hoy, recibo mi grado de Doctor en Ciencias, con una tesis de grado que requirió mucho esfuerzo de mi parte, dedicación, momentos difíciles pero también gratificantes y que estoy segura, me pondrá otra vez en el camino que algún día interrumpí por llenarme de aventuras y conocimientos en este país al Sur lejos de mi tierra, Colombia.



AGRADECIMIENTOS

A Dios,

por guiar mi vida, ser gestor de grandes oportunidades y estar a mi lado aún cuando yo ignoraba su presencia

A mi madre, Luz Marina Córdoba

por impulsarme a volar y apoyarme incondicionalmente en todo lo que implicara mi crecimiento profesional.

A mi padre, Darío Saldarriaga

quien me enseñó a valerme por mi misma y a mirar mas allá de mi entorno familiar.

A mi tutor, Marco Méndez

porque creyó en mi y me dio la posibilidad de realizar mi investigación en un país donde los animales venenosos no representan una prioridad

A mi cotutor y amigo, Mahmood Sasa

quien invirtió todo su conocimiento sobre "La Terciopelo", tiempo y mucha paciencia para ayudarme a convertir en realidad mi sueño de proyecto de tesis

A mi comisión de tesis, Dr. Elie Poulin, Rodrigo Medel, Felipe Hinojosa y Eduardo Palma, quienes fueron mi primer cable a tierra durante el doctorado.

A CONICYT,

por su valioso apoyo financiero, tanto en mi manutención en Chile como en la financiación de mi proyecto de Tesis doctoral

A Juan Daza, por su valiosa ayuda en los análisis moleculares

A los amigos , cada uno sabe quien es sin nombrarlo,

por escucharme, por acompañarme, por entenderme y por enseñarme que no hay limites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mi.

Por último quiero agradecer a todas aquellas personas quienes sin esperar nada a cambio compartieron pláticas y conocimientos que contribuyeron a hacer realidad este sueño de cinco años



ÍNDICE DE CONTENIDOS



RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xiii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1 - 28
1.1. Filogenia y sistemática del género <i>Bothrops</i> , con énfasis en el grupo <i>B. atrox-B. asper</i>	1- 8
1.2. Aspectos taxonómicos, ecológicos, biológicos y toxinológicos de <i>Bothrops asper</i>	8 -16
1.3. Historia geológica del área de distribución de <i>Bothrops asper</i> en la región Neotropical (Mesoamérica y noroccidente de América del Sur) e implicancia en su posible origen y patrón de distribución.....	17 - 20
1.4. Metodologías utilizadas en los estudios de variabilidad genética, con énfasis en marcadores moleculares y estimación de tiempos de divergencia en Linajes de serpientes Neotropicales.....	20 - 25
1.5. Planteamiento de objetivos e Hipótesis.....	25 - 28
CAPITULO II. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y ORIGEN DE UN DEPREDADOR MORTAL: LA FILOGEOGRAFÍA DE LA VÍBORA DE FOSA BOTHROPS ASPER (GARMAN 1884) EN EL NEOTRÓPICO.....	29 - 79
CAPITULO III. PHENOTYPIC DIFFERENCES IN A CRYPTIC PREDATOR: FACTORS INFLUENCING MORPHOLOGICAL VARIATION IN THE TERCIOPELO BOTHROPS ASPER (GARMAN, 1884; SERPENTES: VIPERIDAE).....	80 - 126
CAPITULO IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	127
4.1. Taxonomía y relación filogenética entre <i>B. asper</i> y el grupo <i>atrox</i>	127 - 129

4.2. Concordancia entre el patrón filogeográfico y morfológico de *B. asper* con atributos biogeográficos.....129 - 134

4.3. Efecto de factores ambientales y adaptación.....135 - 137

4.4. Implicaciones taxonómicas.....137 - 138

4.5. Consideraciones finales.....138 - 140

CONCLUSIONES.....141 - 143

BIBLIOGRAFÍA.....144 - 184

Anexo. Artículo publicado en *Toxicon*

Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* i(Garman, 1884; Serpentes: Viperidae)



TABLAS

CAPITULO II. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y ORIGEN DE UN DEPREDADOR MORTAL: LA FILOGEOGRAFÍA DE LA VÍBORA DE FOSA *BOTHROPS ASPER* (GARMAN 1884) EN EL NEOTRÓPICO.

Tabla 2.1. Modelos de Evolución de las secuencias seleccionados por el criterio *Akaike* Se muestran los resultados para todos los datos y las seis particiones utilizadas en el análisis de IB. Abreviaturas: PC, Posición del Codón; Frec, Frecuencia; Pinvar, Proporción de sitios invariables ; PFG, Parámetro de la forma Gamma50

Tabla 2.2. Descripción de los nodos y linajes indicados en las Figuras 2.2 y 2.3. El asterisco (*) indica los nodos no soportados.....53

Tabla 2.3. Medidas de la divergencia genética neta dentro y entre los grupos de *B. asper* obtenidos en el análisis filogenético. Los promedios de las distancias *p* no corregida, están indicados bajo la diagonal. Sobre la diagonal son indicados los errores estándar calculados de 1000 replicas. BA: *Bothrops* Antillas. Ga: Grupo *atrox*.....61

Apéndice A.....78 - 79

CAPITULO III. PHENOTYPIC DIFFERENCES IN A CRYPTIC PREDATOR: FACTORS INFLUENCING MORPHOLOGICAL VARIATION IN THE TERCIOPELO *BOTHROPS ASPER* (GARMAN, 1884; SERPENTES: VIPERIDAE)

Table 3.1. Geographical and sexual variation in *Bothrops asper* morphological characters. Abbreviation: n= sample size; SD= Standard Deviation; S= Sex; F= Female; M= Male; Md, Median; SC= Statistical Comparison (Mann Withney-U); MNCA, Mexico and Nuclear Central America; CICA, Caribbean Isthmian Central America; PCR, Pacific Costa Rica; CH, Chiriquí Province; CCP,

Caribbean Central Panama; DRN, Darién; PC, Pacific Colombia; MV, Magdalena Valley; CC, Caribbean Colombia. Significant differences are shown in gray.....96

Table 3.2. ANOSIM results comparing *B. asper* males (a) and females (b) from nine physiographic regions. R-values are shown above diagonal (R=1, if all individuals within a population are more similar to each other than to any individual in another population, and R=0 if there is no difference between populations). P-values below diagonal (significance at $P < 0.05$, shown in gray). Region abbreviations as in Table 3. 1.....100

Table 3.3. Contribution of morphological variables in the distinction of *B. asper* samples from various physiographic regions within the species distributional range. SIMPER analysis for males (a), and females (b). Below and above the diagonal the type of morphological variable and its contribution (%) are shown, respectively. Abbreviation: n = sample size; V, Ventral scales; B, Blotch number; I, Interrictal scales; S, Subcaudal scales; NS, no significant. Region abbreviations as in text. Gray area represent the difference in type of variable between males and females.....102

Table 3.4. Mean (below diagonal) and Standard error (above diagonal) of sequence divergence (p distance) among *B. asper* groups and outgroup (*B. caribbaeus* and *B. lanceolatus*).....105

Table 3.5. Matrix correlation table, Mantel tests using 10000 iterations. Abbreviation: r, correlation coefficient between matrices; P, probability.....107

FIGURAS

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1.1. Grupo *B. asper* – *atrox*.....4

Figura 1.2. Ejemplar hembra de *Bothrops asper* procedente de la localidad de Puerto Berrío (Antioquia, Colombia).....12

Figura 1.3. El área sombreada representa la distribución geográfica de *Bothrops asper* en la región Neotropical (área de distribución basada en Campbell y Lamar, 2004).....13

Figura 1.4. Bosque húmedo. Estación Biológica “La Selva”, Costa Rica.....14

CAPITULO II. perspectiva histórica y origen de un depredador mortal: La filogeografía de la víbora de fosa *Bothrops asper* (Garman 1884) en el Neotrópico.

Figura 2.1 Distribución de las muestras de *Bothrops asper* en Mesoamérica y Sur América. El área en color muestra la distribución geográfica basada en Campbell y Lamar (2004). Los puntos representan las localidades de donde los especímenes fueron secuenciados.....38

Figura 2.2. Árbol de consenso de mayoría de 100 árboles con el mismo valor de parsimonia (1179 pasos). Este árbol fue obtenido mediante el método de búsqueda heurística con las secuencias combinadas de los genes *Cit b* y ND4. El valor bootstrap de robustez es indicado bajo cada rama (los valores por debajo del 50% no son indicados). Las letras mayúsculas señalan los nodos descritos en la Tabla 2.2.....56

Figura 2.3. Árbol filogenético inferido del análisis de Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano con diferentes modelos para cada partición de los datos (Tabla 2.1). El soporte bootstrap (izquierda) y probabilidad a posteriori (derecha) son indicadas próximas a los nodos. Las letras mayúsculas señalan los nodos descritos en la Tabla 2.2.....57

Figura 2.4. Árbol Bayesiano que muestra los tiempos de divergencia entre los diferentes grupos de *B. asper*, el grupo *atrox* y las *Bothrops* de las Antillas menores. Puntos de calibración: 1: *Crotalus atrox* / *C. ruber*. 2. *Sistrurus*. 3. *Agkistrodon*.....59

Figura 2.5. Correlación entre distancia genética (JC69) y distancia geográfica (Euclidiana) entre localidades muestreadas de *Bothrops asper*.....62

Figura 2.6. Estructura filogeográfica de *Bothrops asper* basada en los genes mitocondriales *Citocromo b* y *ND4*. El nombre de cada linaje esta dado en las Figuras 2.2 y 2.3.....66

CAPITULO III. PHENOTYPIC DIFFERENCES IN A CRYPTIC PREDATOR: FACTORS INFLUENCING MORPHOLOGICAL VARIATION IN THE TERCIOPELO *BOTHROPS ASPER* (GARMAN, 1884; SERPENTES: VIPERIDAE)

Fig. 3.1. Map of Middle America and northern South America showing sampling sites for *B. asper* samples used in this study. Dots represent the localities from where specimens were collected. Inset map shows CH, CCP and DRN physiographic regions in Panama. Elevations above 1000 m are shown in gray shades.....90

Figura 3.2. Multidimensional scaling plot showing separation of *B. asper* males (a) and females (b) from nine physiographic regions in terms of meristic characters. An analysis of similarity supports significant clustering among several groups; see Table 3. 2 for abbreviations and Anosim results.....98

Figure 3.3. Bayesian phylogenetic and posterior probabilities for groups based on the combined two – gene data set analyzed under the GTR+ Γ +G model. Tip labels include country or specific locality where *B. asper* specimens were sampled (Appendix 3.2). Group abbreviations as in text.....104

RESUMEN

La terciopelo, *Bothrops asper*, es una serpiente venenosa críptica que se distribuye ampliamente en ambientes húmedos de Mesoamérica y en el noroccidente de América del Sur. A través de su rango de distribución, *B. asper* presenta una gran variación morfológica en caracteres externos. Esta variación ha dificultado su correcta separación de otras especies relacionadas (grupo *atrox*) con las cuales *B. asper* es similar en apariencia y presenta solapamiento en los caracteres merísticos que han sido frecuentemente utilizados en su identificación taxonómica. En este trabajo, analizamos la variación molecular y fenotípica de *B. asper* a lo largo de su rango de distribución, con los siguientes objetivos generales: 1) Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman el grupo *atrox* y *B. asper* procedente de Mesoamérica y del norte de América del Sur, y 2) Caracterizar la variación molecular y fenotípica de *B. asper* a lo largo de su rango de distribución. La variación molecular fue realizada con los fragmentos del gen *Citocromo b* y el gen de la deshidrogenasa, subunidad 4 (*NADH 4*). Para el análisis morfológico se construyó una matriz con 514 individuos de 9 regiones fisiográficas (México y América Central Nuclear, América Central Ístmica Caribe, Pacífico de Costa Rica, Chiriquí, la región occidental y central de Panamá, Darién, las regiones Pacífica y Caribe de

Colombia y el Valle del Magdalena). El análisis filogenético recuperó al grupo *atrox* como monofilético y seis linajes divergentes correspondientes a individuos de *B. asper* (**linaje 1**: México y América Central Nuclear; **linaje 2**: América Central Ístmica, región Caribe; **linaje 3**: Pacífico de Costa Rica; **linaje 4**: región Pacífica de Colombia y Panamá; **linaje 5**: región Caribe de Colombia; y **linaje 6**: Valle del Magdalena). La politomía observada dentro de los linajes de *B. asper* no permitió determinar la relación filogenética entre *B. asper* y el grupo *atrox* ni tampoco permitió considerar a *B. asper* como monofilética. Los linajes de *B. asper* mostraron un patrón filogeográfico concordante con atributos fisiográficos presentes en el área de distribución. Sin embargo, la no relación de grupo hermano entre los linajes 2 y 3, y el linaje 4 con los linajes 5 y 6, no permitió soportar la hipótesis del efecto vicariante de la Cordillera de Talamanca y la Cordillera de los Andes, respectivamente. La fecha de divergencia obtenida mostró que los eventos cladogénicos en *B. asper* coinciden con el periodo máximo de orogénesis de las cadenas montañosas en Mesoamérica y en el noroccidente de América del sur durante el Plio-Pleistoceno. El análisis univariado y multivariado evidenció gran diferenciación fenotípica entre los grupos preestablecidos. El patrón de diferenciación fenotípica fue congruente entre sexos, pero no reflejó la historia filogenética. La variación geográfica en el

número de escamas interrietales, ventrales, subcaudales y manchas dorsales estuvo correlacionada positivamente con la latitud y el número de meses secos , pero inversamente relacionada con el nivel de precipitación. Estos resultados permiten plantear la hipótesis de una posible adaptación a presiones de selección para el balance hídrico, termorregulación o crípsis más que un reflejo de la filogenia. Nuestros resultados sugieren que en la variación fenotípica de *B. asper* están implicados diversos factores como fuerzas selectivas, adaptación local, desacople entre morfología y moléculas y además, variación clinal. Si los factores mencionados anteriormente determinan la variación fenotípica en *B. asper*, éstos deben ser considerados para explicar la confusión taxonómica existente entre *B. asper* y especies relacionadas, particularmente las especies que conforman el grupo *atrox*.

Palabras clave: *Bothrops asper*, grupo *atrox*, variación fenotípica, variación molecular, región Neotropical, orogénesis, tiempos de divergencia, variación clinal, nivel de precipitación anual, convergencia fenotípica, especiación alopátrica.

ABSTRACT

The Terciopelo, *Bothrops asper* is a cryptic poison snake widely distributed in humid environments of Middle America and the North-Western portion of South America. Throughout its extensive distribution range, *B. asper* exhibits great morphological variation in external characters. This variation has complicated its proper separation from other related species (*atrox* group). Some members of this group (including *B. asper*) are superficially similar in appearance, especially in their cryptic color patterns and they show high overlap in meristic characters which have been commonly employed in the *B. atrox-asper* taxonomic identification. In this work, we analyse the molecular and phenotypic variation of *B. asper* throughout its extensive distribution range with the following general objectives: 1) To establish the phylogenetic relationships among the *atrox* group species and *B. asper* from Middle America and the North-Western portion of South America and 2), to characterize the molecular variations in the *B. asper* distribution. For the morphological analysis, a phylogenetic analysis was performed using two fragments of mitochondrial genes, Cytochrome b (*Cyt b*) and *ND4*. In order to determine the morphological variation in *B. asper*, we constructed a database for 514 individuals (218 males

and 296 females) obtained from nine distinct physiographic regions [Mexico and Nuclear Central America (MNCA), Caribbean Isthmian Central America (CICA), Pacific Costa Rica (PCR), Chiriquí (CH), Caribbean and Central Panama (CCP), Darien Region (DRN), Pacific Colombia (PC), Magdalena Valley (MV) and Caribbean Colombia (CC)]. The phylogenetic analysis, based on mitochondrial sequences, suggests to *atrox* group as monophyletic and the intraspecific phylogeny of *B. asper* reveals six clearly distinct lineages with high Bayesian posterior probabilities: **lineages** 1 and 2 comprising individuals from the Caribbean of Middle America [MNCA-CICA]; **lineage 3**, which includes individuals from the Pacific slope of Costa Rica [PCR]; **lineage 4**, which includes individuals from Darien and the Chocoan region [DRN-PC], **lineage 5**, which includes localities in the Caribbean Coast and the Magdalena Valley of Colombia [CC-MV], respectively. The politomy showed in our phylogenetic tree did not allow us to determine the phylogenetic relationships between *B. asper* and the *atrox* group and to establish *B. asper* as monophyletic. The *Bothrops asper* lineages showed correspondence with physiographic attributes found in its distribution range. However, the absence of relationship of sister group among the lineages 2 and 3 and the lineage 4 with lineages 5 and 6 did not permit to support the hypothesis of vicariance effect from Talamanca and the Colombian

Andes, respectively. The divergence time showed that *B. asper* lineages appear to have diverged in the Pliocene or earlier (Plio-Pleistocene) and it is coincident with the period in which this mountain reached its modern elevations. The univariate and multivariate morphological analyses revealed a high level of phenotypic differentiation in the established groups. The phenotypic differentiation pattern was consistent among the sexes but it did not reflect the phylogenetic history. The geographic variation in the number of interrials, ventral scales, subcaudal scales and dorsal blotches was positively correlated with latitude and the number of dry months, but inversely related with the precipitation level. The observed relationships between scale counts and environmental variables are explained in terms of selective pressures to improve water balance along the distributional range of the species and rather than a phylogenetic reflect. Our results suggest that in the phenotypic variation in the *B. asper* there are several factors implicated, such as selective forces, local adaptation, morphological and molecular incongruence and clinal variation. If the above factors determine the phenotypic variation in *B. asper* they must be taken into account in order to explain the taxonomic confusion of *B. asper* and related species, particularly the *atrox* group species.

Key words: *Bothrops asper*, *atrox* group, phenotypic variation, molecular variation, Neotropical Region, orogenesis, divergence time, clinal variation, phenotypic Convergence, annual precipitation levels, allopatric speciation.

CAPÍTULO I-

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Filogenia y sistemática del género *Bothrops*, con énfasis en el grupo *B. atrox*- *B. asper*.

El género *Bothrops* representa un grupo diverso de serpientes venenosas responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos en la región Neotropical. Este género está comprendido por 37 especies de serpientes que se distribuyen principalmente en la región continental de América del Sur, aunque hay algunas poblaciones insulares (Campbell y Lamar, 2004). Solamente dos especies (*Bothrops punctatus* y *Bothrops asper*) presentan su rango de distribución hasta América Central. *Bothrops punctatus* está distribuida en la región del Chocó (noroccidente de Ecuador y occidente de Colombia) hasta la región oriental de Panamá, mientras que la distribución de *B. asper* va desde el noroccidente de América del Sur hasta la región de Tamaulipas en México (ver mayor descripción de la distribución de *B. asper* en la sección 1.2).

Con respecto a la taxonomía del género *Bothrops*, las primeras investigaciones fueron realizadas mediante métodos de la sistemática tradicional, utilizando características anatómicas, patrones de coloración y

métodos de morfometría lineal. Estos análisis subdividieron inicialmente a *Bothrops* en los géneros *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Ophryacus* y *Bothrops* (Burger, 1971). Dentro del género *Bothrops*, este autor reconoció cuatro grupos: grupo *atrox*, en el cual incluyó especies con una escama lacunolabial (*B. andina*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. brazili*, *B. caribbaea*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. lanceolata*, *B. lojana*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. picta*, *B. pifanoi*, *B. pirajai*, *B. pradoi*, *B. pulcra*, *B. santaecrucis*, *B. xanthogramma*), y los grupos *neuwiedii*, *alternata* y *ammodytoides*, en los cuales incluyó especies con la escama lacunolabial dividida. Posteriormente, se utilizaron otras aproximaciones que combinaron evidencias morfológicas y bioquímicas, como análisis morfológicos de hemipenes y electroforesis de proteínas plasmáticas. En estos estudios Pesantes – Segura et al. (manuscrito no publicado, *sensu* Campbell y Lamar, 2004), reconocieron 6 grupos dentro del género *Bothrops*, entre ellos el grupo *atrox* (definido por Burger, 1971) conformado por un número menor de especies (*B. atrox*, *B. moojeni*, *B. pradoi* y *B. marajoensis*).

El primer análisis cladístico de las víboras de fosa de la región Neotropical fue realizado por Werman (1992). Este estudio se basó en isoenzimas y aloenzimas de 10 especies de *Bothrops* y una especie de *Bothriopsis*. Los resultados del análisis de parsimonia soportaron dos clados: 1) *B. pradoi*, *B. atrox*,

B. brazili, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. jararaca* y *Bothriopsis taeniata*; y el clado 2) *B. neuwiedi*, *B. erythromelas*, *B. alternatus* y *B. itapetiningae*. El clado 1 es la primera evidencia que *Bothrops* es parafilético con respecto a *Bothriopsis*. En análisis posteriores utilizando genes mitocondriales (*Citocromo b*), Salomão et al. (1997) estableció las relaciones filogenéticas entre 11 especies de *Bothrops* y una especie de *Bothriopsis*. En este estudio se demostró la monofilia del grupo *atrox* conformado por *B. atrox*, *B. isabelae*, *B. leucurus*, *B. moojeni* y *B. marajoensis*. Cabe mencionar que Salomão et al. (1997), no diferenció entre *B. atrox* y *B. asper* en sus análisis (Figura 1.1).

La evidencia molecular más reciente con los genes mitocondriales 12S, 16S, *Citocromo b* (*Cit b*) y *NADH* deshidrogenasa subunidad 4 (*ND4*) (Casto y Parkinson, 2006), indica que el género *Bothrops* se divide en tres grandes grupos: (1) *B. ammodytoides*, *B. cotiara* y *B. alternatus*, (2) *B. jararacussu*, *B. atrox* y *B. asper*, y (3) *B. insularis*, *B. erythromelas* y *B. diporus* (ver también Parkinson, 1999; Parkinson et al., 2002a; Salomão et al., 1997; Werman, 1992; Wüster et al., 2002a). Todas estas especies, excepto *B. asper* habitan las tierras bajas de la región Cisandina de América del Sur, al oriente de la Cordillera de los Andes, desde Colombia hasta Argentina (Martins et al., 2001; Campbell y Lamar, 2004). *B. asper* dentro del género *Bothrops* es la única especie que se distribuye desde el

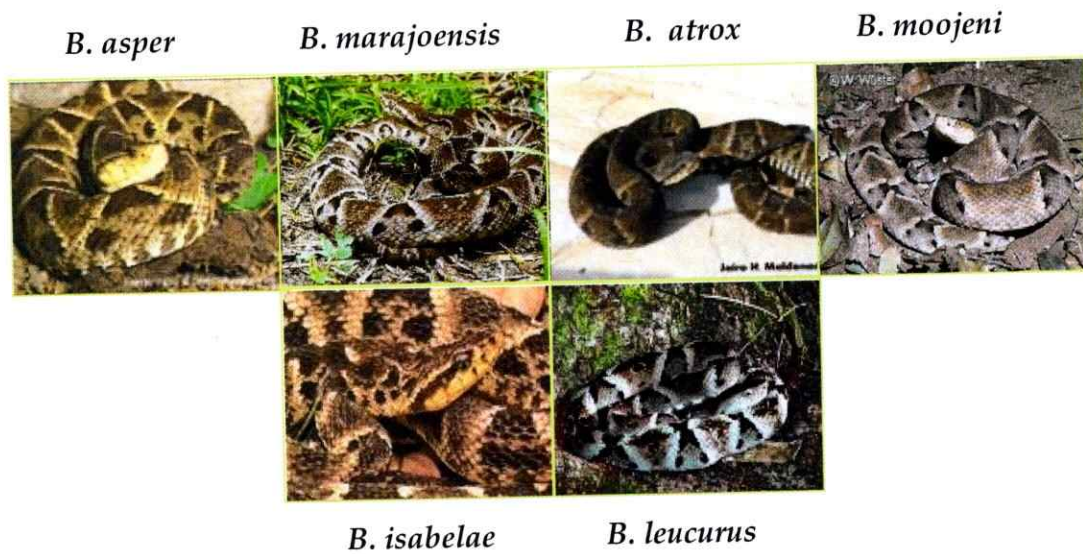


Figura 1.1. Grupo *B. asper - atrox*

nor-occidente de América del Sur hasta México (región de Tamaulipas) (Campbell y Lamar, 2004). Muchas de estas especies que habitan las tierras bajas de la cuenca de la Amazonía hacia el norte en Mesoamérica son similares en cuanto a su fenotipo, lo que ha dificultado su diferenciación taxonomica, especialmente en la determinación de *B. asper* con *B. atrox*. Muchos autores han sugerido la necesidad de definir la sistemática de *B. asper*, *B. atrox*, *B. marajoensis* y *B. moojeni*. Wüster et al. (1996), realizó un análisis multivariado con caracteres morfológicos de *B. atrox*, *B. marajoensis* y *B. moojeni* y encontró poblaciones fenotípicamente intermedias (zona híbrida) en regiones geográficas donde *B. atrox* y *B. moojeni* son simpátricas, aunque estas dos especies son evidentemente

distintas. Por otro lado, las muestras de *B. marajoensis* fueron variables y menos diferenciadas de *B. atrox*. Wüster et al. (1996) fueron renuentes a rebatir o soportar la validez de *B. marajoensis*, con base en sus resultados, pero este estudio enfatizó uno de los muchos problemas en la diferenciación taxonómica de estos taxa. Posteriormente, Wüster et al. (1997, 1999), realizaron un análisis multivariado con caracteres morfológicos y secuencias del gen del Citocromo b, para determinar el patrón de variación geográfica entre las especies del complejo *Bothrops atrox* (*sensu* Salomão et al., 1997). Este trabajo nuevamente soportó que las poblaciones convencionalmente asignadas a *B. atrox* y *B. moojeni* son morfológicamente distintas, con una zona fenotípica intermedia en zonas de simpatria. Además, estos resultados demostraron la poca diferenciación entre *B. marajoensis*, *B. isabellae*, *B. leucurus* y *B. pradoi* con *B. atrox*.

El alto grado de solapamiento entre los caracteres merísticos utilizados en el reconocimiento y clasificación de *B. asper* y *B. atrox* han generado un debate a nivel taxonómico que no ha permitido establecer sus relaciones filogenéticas (Markezich y Taphorn, 1993; Sasa, 2002). Algunos autores (Wilson y Meyer, 1985; Villa et al., 1988; Schätti y Kramer, 1991) consideran a *B. asper* coespecífica con *B. atrox*. Sin embargo, Campbell y Lamar (1992) y Peters y Orejas-Miranda (1970), basados en caracteres morfológicos, señalan que son especies diferentes.

Markezich y Taphorn (1993), realizaron un estudio sobre variación en caracteres morfológicos de *B. asper* y *B. atrox* que habitan una zona de posible simpatria en Venezuela. En este estudio no fue posible distinguir entre *B. atrox* y *B. asper*, y los datos morfológicos indicaron la presencia de un único taxón polimórfico. Por lo anterior, Markezich y Taphorn (1993), han propuesto que la confusión taxonómica que presentan estos dos taxa tiene relación con la alta variación intraespecífica en los caracteres merísticos usados en su taxonomía y sugieren que un análisis de la variación intrapoblacional en el rango de distribución de ambos taxa, podría contribuir a esclarecer el problema *B. asper*-*B. atrox*.

Sasa (2002), encontró dimorfismo sexual, variación ontogénica y divergencia morfológica entre distintas poblaciones de *B. asper* de Mesoamérica, y demostró además, una correlación positiva entre distancia geográfica y morfológica, lo cual permitió diferenciar las poblaciones en dos grupos: El primero, conformado por individuos procedentes de diferentes localidades de México, Guatemala, Belice y Honduras y, el segundo, conformada por las poblaciones de Nicaragua, Costa Rica y Panamá. En Colombia, investigaciones recientes realizadas con morfometría tradicional, no soportan la hipótesis que propone a *B. asper* y *B. atrox* como dos especies distintas (Hoyos et al., 2003). Sin embargo, sí existen diferencias en los efectos farmacológicos y enzimáticos de sus venenos.

Saldarriaga et al. (2003), demostró que el veneno de *B. asper* de localidades ubicadas en el Valle del Magdalena al occidente de la Cordillera de los Andes presentan una mayor actividad letal, mayor efecto coagulante y mayor actividad hemolítica indirecta, que el veneno de *B. atrox* procedentes del departamento del Meta localizado al Oriente de los Andes en Colombia. Cabe mencionar que factores como la variabilidad en la composición del veneno, en la época reproductiva y diferenciación genética, son considerados con frecuencia en estudios taxonómicos en serpientes para definir el nivel de subespecie o especie (Zamudio y Greene, 1997).

Entre los diversos estudios dirigidos a establecer las relaciones filogenéticas, entre diferentes especies de víboras de fosa neotropicales, seis de ellos han incluido en sus análisis filogenéticos una secuencia de *B. asper* de origen mesoamericano (*B. asper* de Belice, Wüster et al., 2002a; Wüster et al., 2002b; y *B. asper* de Costa Rica, Parkinson, 1999; Sasa y Barrantes, 1998; Parkinson et al., 2002a; Castoe y Parkinson, 2006). En todos los estudios, excepto en Parkinson (1999), los autores sugieren una relación de grupo hermano entre *B. asper* y las especies que conforman el grupo *atrox*.

En conclusión, la historia taxonómica de *B. asper* ha sido compleja y sus relaciones filogenéticas dentro del género *Bothrops* específicamente con el grupo

atrox aún no están definidas. Por lo tanto para esclarecer la historia evolutiva de este género, es necesario llevar a cabo estudios moleculares mas integrales, en los cuales se incorpore un número mayor de individuos y se utilicen caracteres moleculares derivados de secuencias de DNA completas. Además, es necesario el desarrollo de nuevas y más sofisticadas herramientas analíticas para inferir patrones filogenéticos

1.2. Aspectos taxonómicos, ecológicos, biológicos y toxinológicos de *Bothrops asper*

Bothrops asper pertenece a la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae. Esta especie presenta una larga historia de cambios taxonómicos, lo cual no es sorprendente debido a su distribución amplia en la región Neotropical y a su carácter conspicuo (Sasa et al., 2009). En 1884, Garman describió la especie como *Trigonocephalus asper* procedente de la localidad de Obispo, Darién, Panamá. Müller (1885) registró *B[othrops] atrox septentrionalis* de una localidad desconocida, presumiblemente de Costa Grande (en Guatemala, de acuerdo con Stuart, 1963). Posteriormente, Cope (1876, 1887) reconoció la especie como un sinónimo de *Bothrops atrox* y durante las próximas 6 décadas, la mayoría de los investigadores siguieron la propuesta de Cope (ver Amaral 1924, 1929; Picado,

1931; Axtell y Wasserman, 1953; Álvarez del Toro, 1960; Hirth 1964; Schätti y Kramer, 1993). Autores como, Taylor (1954) y Smith y Taylor (1945), reconocieron a *B. asper* como subespecie de *B. atrox* de América del sur. El trinomio *Bothrops atrox asper* fue adoptado principalmente por investigadores en los efectos clínicos y toxinológicos del veneno de esta especie (Jiménez-Pórras, 1964). La nomenclatura binomial aceptada actualmente para esta especie es *Bothrops asper* (Campbell y Lamar, 1989, 2004; McDiarmid et al., 1999), la cual fue asumida después de los trabajos de Hoge (1966), Peters y Orejas-Miranda (1970), Burger (1971) y Bolaños (1984).

Etimológicamente, el nombre de *Bothrops asper* proviene del griego *bothros* (masculino) que hace referencia a la foseta termoreceptora ubicada entre el ojo y el orificio nasal (Campbell y Lamar, 2004) y el nombre de la especie deriva del Latín *asper* (áspera), probablemente como una referencia a las escamas quilladas (Campbell y Lamar, 2004).

Los nombres comunes de esta especie difieren de acuerdo al lenguaje, región, tamaño de la serpiente y patrón de coloración: *terciopelo* usado en Nicaragua, Costa Rica y Panamá, en relación a la apariencia aterciopelada que presenta su piel en época de post muda; *rabo Amarillo*, es usado en América Central y Colombia por la punta brillante de la cola de color amarillo de los machos recién

nacidos; barba amarilla es usado en América central y Colombia en referencia a la coloración cremosa de las labiales superiores que contrastan con el color oscuro de la cabeza; *tiznada* en Costa Rica y Panamá debido al color oscuro del cuerpo; *toboba* real usado en Costa Rica para individuos de gran tamaño; *nauyaca* (a *Nahuatl*) usado en México y Guatemala, su significado es "cuatro narices", en alusión a las fosas nasales y las fosetas loreales o termorreceptoras (Campbell y Lamar, 2004); *equis* ("x"), usada en Panamá, Colombia, Ecuador y Venezuela, haciendo alusión al patrón en zig-zag de las manchas corporales y líneas de la vista dorsal; *pueridora* usado en Ecuador y Colombia en referencia a la necrosis inducida por su veneno (ver una lista mas amplia de nombres vernaculares en Campbell y Lamar, 2004).

Bothrops asper es una serpiente de gran tamaño (longitud máxima registrada de 250 cm), con una evidente variación morfológica en caracteres merísticos externos. Esta especie, presenta dimorfismo sexual y las hembras son significativamente mas grandes, con un mayor numero de hileras de escamas dorsales del medio cuerpo, y una menor cantidad de escamas subcaudales que los machos. La coloración dorsal es café, oliva, o gris y el vientre es generalmente crema, immaculado o con manchas oscuras. Presenta una banda estrecha postorbital oscura (1-2 escamas de amplitud), la cual se extiende desde

la parte posterior del del ojo hasta el ángulo del hocico (**Figura 1.2** Ver mayor descripción en Campbell y Lamar, 2004).

En la región Neotropical, *Bothrops asper* presenta una distribución continua desde la vertiente Caribe de Tamaulipas (México), a través de las tierras bajas del Caribe (Flores-Villela et al., 1987) incluyendo la Península de Yucatán (Lee, 1996; Campbell, 1998), América Central (Wilson y Myers, 1985; Savage 2002), noroccidente de Colombia, Trinidad y Venezuela. Sobre la vertiente Pacífica, *B. asper* presenta una población disyunta en el occidente de Chiapas y Guatemala (Álvarez del Toro, 1960; Campbell and Vannini, 1989). En la región noroccidental de Costa Rica, esta especie atraviesa hacia el Pacífico en zonas de elevaciones moderadas de la Cordillera de Guanacaste (Solórzano, 2004), y se distribuye ampliamente desde las tierras bajas del pacífico Central de este país, hacia el sur y a lo largo de la vertiente pacífica de los Andes en Colombia y Ecuador hasta el extremo norte de Perú (Peters y Orejas-Miranda, 1970; Freire-Lascano y Kuch, 1994) (**Figura. 1.3**). Las poblaciones insulares de *B. asper* incluyen la Isla Violines (Costa Rica), Gorgona (Colombia) y Trinidad.

Bothrops asper tiene una distribución amplia en tierras bajas (0 a ~600 m), sin embargo en Mesoamérica y al noroccidente de América del Sur (Colombia y Ecuador), hay registros de esta especie en un rango altitudinal moderado (600 a

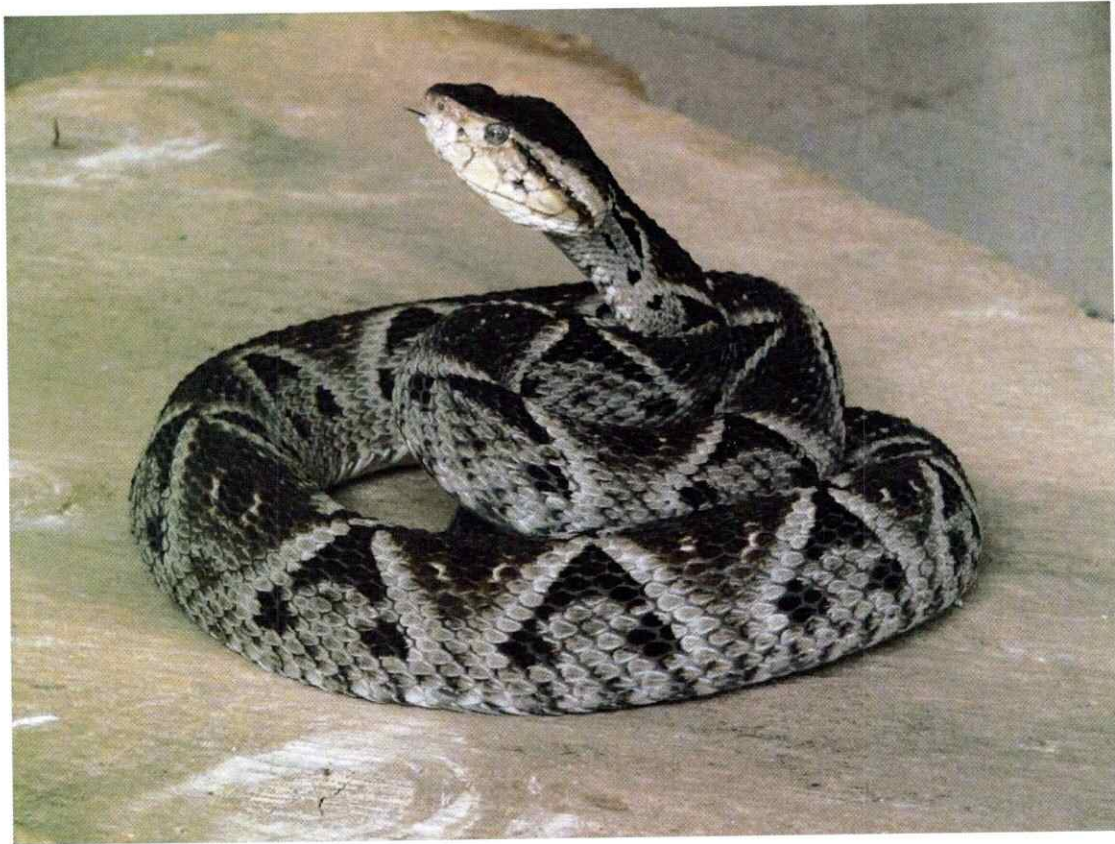


Figura 1.2. Ejemplar hembra de *Bothrops asper* procedente de la localidad de Puerto Berrío (Antioquia, Colombia).

1,300 m). En Mesoamérica, el máximo registro altitudinal es de 1,500 m (Costa Rica: Alto Telire en el Caribe de Talamanca) y en América del Sur, la altitud máxima registrada es de 2,640 m en Colombia (Campbell y Lamar, 2004) y 1,500 m en el Chimborazo, Ecuador (Freire-Lascano y Kuch, 1994). Aunque la “Terciopelo” habita principalmente en ambientes húmedos (**Figura 1.4**), es

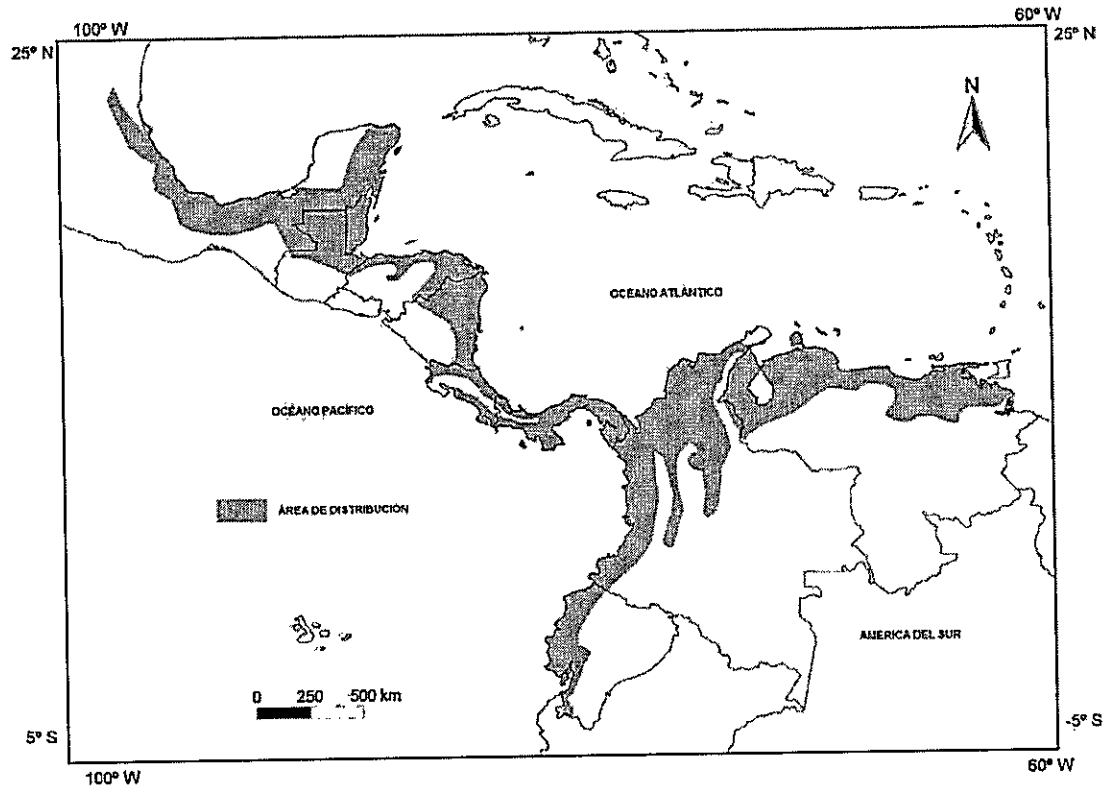


Figura 1.3. El área sombreada representa la distribución geográfica de *Bothrops asper* en la región Neotropical (área de distribución basada en Campbell y Lamar, 2004).

posible encontrarla en la mayoría de las zonas de vida localizadas a bajas y medias elevaciones, excluyendo las zonas que tienen periodos secos estacionales (Campbell y Lamar, 2004). En bosques secos o deciduos, esta especie se restringe principalmente a vegetación riparia y siempre verde, a lo largo de ríos permanentes los cuales constituyen un refugio durante periodos secos (Freire-



Figura 1.4. Bosque húmedo. Estación Biológica “La Selva”, Costa Rica.

Lascano y Kuch, 1994). Esto ocurre en el noroccidente de Costa Rica y en la costa caribe en Colombia (Campbell y Lamar, 2004). La dieta de *B. asper* quizás refleja oportunismo y exhibe una gran plasticidad en el uso de sus recursos (Sasa et al., 2009). Esta especie consume una gran variedad de tipos de presas, siendo las más importantes los roedores, las aves y los anfibios, y en menor frecuencia centípedos, lagartos, serpientes y peces, principalmente como dieta de los especímenes juveniles (Boada et al., 2005). *Bothrops asper*, emplea diferentes

tácticas depredatorias según el tamaño, fuerza, comportamiento defensivo y nivel de amenaza de la presa. Los especímenes adultos asechan sus presas en la noche (cuerpo enroscado y la cabeza levantada en un ángulo de 45°; Greene, 1992). La serpiente permanece inmóvil en esta posición hasta que detecta una presa potencial (Sasa et al., 2009). En el caso de juveniles, el asecho también es una táctica depredatoria, sin embargo existen reportes de terciopelos cazando ranas a ras del suelo del bosque (Sasa et al., 2009).

Bothrops asper es una serpiente con poca vagilidad. La mayor parte de sus movimientos consisten en cortas distancias (<10m) entre el refugio diurno y los sitios de asecho nocturno. Sin embargo, se han observado desplazamientos a mayores distancias en búsqueda de diferentes sitios para obtener alimento (>50m). Estos recorridos a distancias mayores incluyen atravesar nadando ríos de 60m de ancho (Sasa et al., 2009).

Esta especie debido a su gran tamaño y a su potente veneno es un adversario imponente aún para el depredador más fuerte. Entre los depredadores que consumen terciopelos adultos los más conocidos son la musaraña (*Soricidae*) y *Clelia clelia* (*Colubridae*). *C. clelia*, es un colúbrido opistoglifo que utiliza su veneno y un fuerte mecanismo de constricción para someter a grandes serpientes, entre ellas *B. asper*. Desde su nacimiento, la musaraña posee en su

plasma inhibidores de toxinas que neutralizan los componentes más tóxicos del veneno de *B. asper* (Cerdas y Lomonte, 1982). Otros depredadores incluyen aves rapaces como halcones (*Herpetotheres cacchinans*), el gavilán tijerilla (*Elanoides forficatus*), y el gavilán patas largas (*Geranospiza caerulescens*). Además, mamíferos como zorrillos (*Conepatus mesoleucus*), el coatí (*Nasua nasua* y *N. narica*), y el mapache (*Procyon lotor*) (Sasa et al., 2009).

En la región Neotropical, *Bothrops asper* es la serpiente venenosa más importante desde el punto de vista epidemiológico, debido a su potente veneno y alta capacidad de adaptación a los ambientes fragmentados cerca de los asentamientos humanos (Campbell y Lamar, 2004). El veneno de esta especie induce un cuadro fisiopatológico complejo, el cual se caracteriza por efectos locales y sistémicos como edema, mionecrosis, hemorragia, desfibrinación, choque y nefrotoxicidad (Otero et al., 1992; Gutiérrez, 1995). Estudios previos han demostrado variabilidad geográfica y ontogénica (Saldarriaga et al., 2003) en los componentes y efectos clínicos de su veneno.

1.3. Historia geológica del área de distribución de *Bothrops asper* en la región Neotropical (Mesoamérica y noroccidente de América del Sur) e implicancia en su posible origen y patrón de distribución.

Bothrops asper es un componente biogeográfico importante dentro de la región Neotropical por su distribución amplia en áreas con una historia tectónica y geológica compleja (Savage, 2002). La geografía de Mesoamérica y el noroccidente de América del sur es el resultado de la interacción de cuatro grandes placas y varios bloques tectónicos (Iturralde-Vinent, 2006; Marshall, 2006). Determinar los eventos históricos implicados en la conformación de la biodiversidad actual del Neotropico es complicado debido a los cambios fisiográficos que han ocurrido en esta región desde el Cretácico. No obstante los avances en las investigaciones en las décadas pasadas, los detalles de la historia geológica de esta región aún están fragmentados y son controversiales (Coney, 1982 ;Iturralde-Vinent, 2006; Mann et al., 2006).

La Depresión de Nicaragua es un graben prominente (fosa tectónica) formado por una zona de afallamiento a través de El Salvador, Nicaragua y el norte de Costa Rica, en la cual yace y aflora material litológico predominantemente volcánico terciario y cuaternario (Marshall, 2006). Esta región separa dos masas de tierras altas, las tierras altas del bloque Chortis al

norte (Honduras y Nicaragua), y las tierras altas de la porción baja de América Central (Costa Rica y Panamá). La evidencia geológica sugiere que existió una separación marina entre las tierras altas de Chortis y la porción baja de América Central durante el Mioceno y la mayor parte del Plioceno (Coates y Obando, 1996; Iturralde-Vinent, 2006). La depresión de Nicaragua ha sido identificada como una de las mayores causas de separación filogeográfica para taxa como ranas (Savage, 1987; Duellman, 1999), Salamandras (Parra-Olea et al., 2004), serpientes (Savage, 1982; Cadle, 1985), plantas, insectos y peces (Marshall y Liebherr, 2000; Halas et al., 2005).

La orogénesis del sistema montañoso de América Central posiblemente ocurrió de norte a sur (Savage, 1982; Coates y Obando, 1996). La Cordillera de Talamanca está ubicada en la zona baja de Mesoamérica (Costa Rica) y su orogénesis ocurrió probablemente en el Mioceno tardío o inicios del Plioceno (8-5 m.a.) y terminó durante el Plioceno con el cierre del Istmo de Panamá, hace aproximadamente 3.5 a 3.0 m.a (Coates y Obando, 1996). Esta conexión permitió el intercambio entre la biota de América Central y América del Sur, favoreciendo la dispersión a gran escala de la fauna terrestre, fenómeno conocido como "El Gran Intercambio Biótico Americano (GABI) (Coates y Obando, 1996; Webb y Rancy, 1996). Un aspecto interesante de la biogeografía

Neotropical es la posible dispersión entre América Central y América del Sur, durante periodos de separación marina (pre-ístmico) de múltiples grupos taxonómicos, principalmente anfibios y reptiles (Hanken y Wake, 1982; Estes y Baez, 1985; Vanzolini y Heyer, 1985; Cadle, 1985; Bermingham y Martin, 1998; Weigt et al., 2005; Wang et al., 2008). La dispersión de los reptiles entre América Central y América del Sur probablemente ocurrió a través de la cadena de islas que conformaban el área que hoy ocupa la porción baja de América Central (Zamudio y Greene, 1997). Según Wüster et al. (2002a) el ancestro que originó al género *Bothrops* ingresó a América del Sur probablemente durante el Mioceno (entre 23 y 10 millones de años atrás), utilizando el puente terrestre que se habría formado entre América Central y del Sur. Dicho ancestro "*Protobothrops*" habría dado origen a todas las especies de *Bothrops*, de las cuales solo *B. asper*, colonizó América Central después del levantamiento del Istmo de Panamá.

En Colombia, la Cordillera de los Andes se divide en tres ramales (Cordilleras Occidental, Central y Oriental) separados por las cuencas sedimentarias de los ríos Cauca y Magdalena (Gregory - Wodzicki 2000). Los levantamientos andinos del Mioceno, fueron más intensos en la Cordillera Central, y culminaron durante el Plioceno entre 2 y 5 m.a (Gregory - Wodzicki, 2000). Según este autor, la altura actual de esta Cordillera fue alcanzada hace 2.7

m.a. (a una tasa del orden de 0.5-3 mm/año). El levantamiento de la Cordillera Central en Colombia inicia la separación de la cuenca del río Magdalena y la del Amazonas, evento que tuvo consecuencias directas en la evolución de numerosas especies hoy conocidas como transandinas, las cuales habitan en la región oriental de los Andes (Gregory- Wodzicki , 2000).

1.4. Metodologías utilizadas en los estudios de variabilidad genética, con énfasis en marcadores moleculares y estimación de tiempos de divergencia en linajes de serpientes Neotropicales.

Las metodologías filogeográficas constituyen una herramienta poderosa, para dilucidar patrones geográficos contemporáneos de subdivisión evolutiva a nivel intra e inter-específico (Avice et al., 2000). El campo de la filogeografía molecular ha progresado en forma considerable con el desarrollo de técnicas de laboratorio basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso frecuente de marcadores moleculares de origen mitocondrial (Avice et al., 2004). Los datos moleculares pueden diferenciar linajes genéticos que presenten convergencia morfológica con historias evolutivas distintas. Esto permite la reconstrucción de componentes históricos o filogenéticos como radiaciones recientes, cuellos de botella o expansiones en poblaciones estructuradas

(Ursenbacher et al., 2008). A partir de la década de los 90 se ha acumulado gran cantidad de estudios filogeográficos que involucran muchos taxa, desde invertebrados hasta plantas superiores, así como diferentes marcadores y técnicas moleculares. Estos estudios han sido realizados principalmente en invertebrados (207 publicaciones en PubMed), mamíferos (207 publicaciones en PubMed), aves (64 publicaciones en PubMed) y peces (109 publicaciones en PubMed). Con respecto a los reptiles, la mayor parte de los estudios filogeográficos han sido realizados en lagartos y en serpientes, con 44 y 23 publicaciones en PubMed, respectivamente.

Parte de la historia del surgimiento de la filogeografía viene entrelazada no sólo con el desarrollo de técnicas moleculares, sino del conocimiento de la molécula de DNA mitocondrial (mtDNA). Dong y Kumazawa (2005) secuenciaron completamente el genoma mitocondrial de seis especies de serpientes (*Acrochordus granulatus*, *Boa constrictor*, *Cylindrophis ruffus*, *Dinodon semicarinatus*, *Leptotyphlops dulcis*, *Ovophis okinavensis*, *Pitón regius* y *Xenopeltis unicolor*) e identificaron 13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia (un total de 37 genes codificantes). Además, la duplicación de la región control y la translocación de tRNA^{Leu}.

Los genes mitocondriales *Citocromo b*, *ND4*, *tRNA*, *ND2*, *12S*, *16S* y región control, son los marcadores moleculares que se utilizan con mayor frecuencia en los estudios filogeográficos en serpientes (Zamudio y Greene, 1997; Burbrink et al., 2000; Pook et al., 2000; Parkinson et al., 2000; Janzen et al., 2002; Carranza et al., 2004; Wüster et al., 2005a; Kuch et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006; Graziotin et al., 2006; Lukoschek et al., 2007; Huang et al., 2007; Wüster et al., 2007; Burbrink et al., 2008; Ursenbacher et al., 2008; Fontanella, 2008; Mulcahy, 2008). Es importante mencionar que los estudios genéticos se han hecho casi en su totalidad con DNA mitocondrial, aunque el uso de haplotipos nucleares es cada vez más frecuente y exitoso conforme se han desarrollado las técnicas moleculares y de interpretación. En serpientes, los genes nucleares han sido poco utilizados en estudios filogeográficos y su uso ha sido más frecuente en estudios filogenéticos a nivel inter-específico (Lawson et al., 2005; Vidal y Hedges, 2005; Sanders et al., 2008 ; Alfaro et al., 2008).

Actualmente, se han desarrollado métodos filogenéticos basados en técnicas bayesianas, que incorporan conjuntos de datos multigénicos para reconstruir filogenias de secuencias divergentes. Estos métodos son interesantes porque incorporan modelos probabilísticos de sustitución de DNA, que podrían disminuir el riesgo de interpretar en forma errónea la complejidad de la

evolución del DNA (Huelsenbeck y Crandall, 1997). Los conjuntos de datos multigénicos quizás contienen particiones que evolucionan bajo diferentes modelos o patrones de evolución. En estos casos, un solo modelo quizás no capture toda la información encontrada en el conjunto de datos, incrementando el error de identificar las sustituciones con alta probabilidad de cambio (y homoplasia), contra sustituciones con baja probabilidad de cambio (con mayor probabilidad de presentar señal filogenética) (Castoe y Parkinson, 2006). Hay varios estudios filogenéticos que han demostrado que el uso de particiones bajo diferentes modelos de sustitución nucleotídica, pueden extraer señales filogenéticas adicionales de los datos, especialmente con secuencias con una saturación alta en el nivel de sustitución de pares de bases (Castoe et al., 2004, 2005; Castoe y Parkinson, 2006).

El uso de secuencias de DNA para estimar el tiempo de eventos evolutivos cada vez se hace más frecuente. Al comparar secuencias homólogas, el número de diferencias en las bases a partir de un ancestro común, es un estimador del tiempo de divergencia entre linajes (Zuckermandl y Pauling, 1965), por lo que la filogeografía emplea estimaciones del reloj molecular, ya sea de DNA mitocondrial o de marcadores nucleares. La hipótesis del reloj molecular fue descrita a mediados de los 60 por Zuckermandl y Pauling (1965) se ha utilizado

para datar patrones y procesos de evolución (Magallón, 2004; Renner, 2005; Rutschmann, 2006; Sanderson et al., 2004; Welch y Bromham, 2005). Esta hipótesis parte del supuesto que los genes evolucionan siguiendo tasas constantes a través del tiempo y entre los diferentes linajes. De esta manera se pueden desarrollar escalas de tiempo para datar eventos evolutivos a partir de un punto de datación conocido (p.e. registro fósil o evento geológico). Evidencia reciente sugiere que la tasa de evolución molecular puede variar considerablemente entre diferentes organismos, cuestionando el concepto de "reloj molecular. Si el supuesto de una tasa constante no es a través de todo el árbol, la inferencia filogenética y la estimación de los tiempos de divergencia pueden ser mal interpretados, a menos que la tasa de heterogeneidad entre linajes sea tomada en consideración (Yoder y Yang, 2000). El LRT (*Likelihood ratio test*) es un método para comprobar si los datos se ajustan a la hipótesis de reloj molecular, y por tanto, si las tasas evolutivas son constantes entre las diferentes regiones amplificadas y a través de los diferentes taxa.

Actualmente, han sido desarrollados varios métodos que no presuponen la hipótesis de reloj molecular (Cutler 2000; Aris-Brosou y Yang 2002; Thorne y Kishino, 2002). Thorne et al. (1998) y Thorne y Kishino (2002) implementaron un método basado en estadística bayesiana que utiliza modelos probabilísticos para

describir los cambios en la tasa evolutiva a través del tiempo, utilizando el procedimiento de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para calcular a posteriori la distribución de las tasas evolutivas y los tiempos de divergencia de cada nodo del árbol. Además, permite el uso simultáneo de diferentes parámetros evolutivos para cada conjunto de datos y la utilización de diferentes puntos de calibración con registros fósiles en el árbol filogenético, creando lo que se conoce como *reloj local* (Yoder y Yang, 2000). En serpientes, específicamente la familia *Viperidae* cuenta con registros fósiles publicados en la literatura (Parmley y Holman, 2007; Holman, 2000; Castoe et al., 2007), lo cual ha facilitado el uso de este método de estimación de tiempos de divergencia entre diferentes linajes de serpientes tales como la familia *Boidae* (Noonan y Chippindale, 2006), el complejo *Bothrops jararaca* (*Viperidae*; Graziotin et al., 2006), el complejo *Naja nigricollis* (*Elapidae*; Wüster et al., 2007) y la Boa rosada (*Lichanura trivirgata*; Wood et al., 2008).

1.5. Planteamiento de objetivos e Hipótesis

En el contexto de la historia geológica compleja de la región Neotropical y dado que, *B. asper* presenta una distribución amplia en esta región, se realizó un estudio de la variabilidad genética y morfológica de *B. asper*. Para los análisis

filogenéticos fueron obtenidas muestras que representan la mayor parte de su rango de distribución en Mesoamérica y en el nor-occidente de América del Sur. Además, fueron incluidas como grupo interno secuencias de las especies que conforman el grupo *atrox*, debido a que las relaciones filogenéticas entre este grupo y *B. asper* aún no están definidas.

Con base en el análisis de características morfológicas, ecológicas, distribucionales, antecedentes históricos sobre la orogénesis del área de distribución de la especie (Coates y Obando, 1996; Gregory - Wodzicki, 2000) y, de las investigaciones previas sobre las relaciones filogenéticas entre el grupo *atrox* y *B. asper* (Wüster et al., 2002a; Wüster et al., 2002b), nosotros planteamos las siguientes hipótesis:

Antecedente bibliográfico: El género *Bothrops* es de origen suramericano y los eventos geológicos ocurridos en el terciario tardío en la región Neotropical (emergencia del Istmo de Panamá) influyeron sobre la dispersión de *B. asper* (Wüster et al., 2002b). **Hipótesis:** Las poblaciones que habitan Mesoamérica constituyen linajes más derivados que las poblaciones procedentes del noroccidente de América del Sur.

Antecedente bibliográfico: *Bothrops asper* es una especie ampliamente distribuida, presenta poca vagilidad y se encuentra principalmente en un rango

altitudinal menor a 1200 m (Campbell y Lamar, 2004; Sasa et al., 2009).

Hipótesis: A lo largo de su rango de distribución, *B. asper* presenta alto grado de estructuración poblacional en áreas bordeadas por barreras geográficas.

Hipótesis: El tiempo de divergencia entre las distintas poblaciones está en correspondencia con la historia geológica de la región.

Antecedente bibliográfico: *Bothrops asper* constituye una especie con alta variación en caracteres merísticos (Sasa, 2002) y se distribuye en zonas con cordones cordilleranos asociados (distribuciones alopátricas) (Campbell y Lamar, 2004). **Hipótesis:** La variación morfológica de *B. asper* a lo largo de su rango de distribución es explicada por la divergencia genética entre las poblaciones alopátricas.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman el grupo *atrox* y *B. asper* procedente de Mesoamérica y del norte de América del Sur. 2) Determinar si *B. asper* muestra un patrón filogeográfico concordante con los atributos fisiográficos presentes en su rango de distribución. 3) Establecer el origen y ruta de colonización de *B. asper* utilizando caracteres moleculares. 4) Determinar la variación morfológica de *B. asper* en su rango de distribución. 5) Establecer una correlación de la variación morfológica encontrada con el patrón filogeográfico, y finalmente, 6)

Evaluar la implicancia de factores ambientales en el patrón de variación morfológico observado.

En el análisis molecular fueron utilizadas dos aproximaciones: (1) análisis filogenético, y (2) estimación de tiempos de divergencia mediante la calibración con fósiles. Este análisis es parte del **capítulo II**. En el análisis morfológico se construyó una matriz de datos con nueve caracteres merísticos que mostraron variabilidad en el trabajo de Sasa (2002) y fueron medidos en individuos procedentes de diferentes localidades de Mesoamérica y Colombia. Los especímenes fueron agrupados y comparados mediante técnicas de estadística no paramétrica univariada y multivariada. Este análisis es parte del **capítulo III**.

CAPITULO II

PERSPECTIVA HISTÓRICA Y ORIGEN DE UN DEPREDADOR MORTAL:

LA FILOGEOGRAFÍA DE LA VÍBORA DE FOSA *BOTHROPS ASPER*

(GARMAN 1884) EN EL NEOTRÓPICO.

Mónica María Saldarriaga Córdoba^{1,2*}, Mahmood Sasa³, Marco A. Méndez¹

¹ Laboratorio de Genómica Evolutiva, INTA, Universidad de Chile. Macul. 5540.

Macul. Santiago. E-mail: monysalda@yahoo.com.ar

² Programa de Ofidismo/Esorpionismo, U. de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Resumen

La víbora de fosa *Bothrops asper* es un componente importante de la región Neotropical. Esta especie es un excelente modelo de estudio para investigar patrones históricos de diversificación, por su amplia distribución en una región biogeográfica que presenta una historia tectónica y geológica compleja, debido a la interacción de cuatro grandes placas y varios bloques tectónicos. Adicionalmente, es la especie más importante desde el punto de vista médico por su potente veneno con capacidad de infligir mordeduras fatales a humanos. Nuestros objetivos fueron: 1) Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman el grupo *atrox* y *B. asper* procedente de Mesoamérica y del norte de América del Sur. 2) Determinar si *B. asper* muestra un patrón filogeográfico concordante con los atributos fisiográficos presentes en su rango de distribución, y 3) Establecer el origen y ruta de colonización de *B. asper* utilizando caracteres moleculares. Las filogenias con genes mitocondriales mostraron seis linajes divergentes y concordantes con los rasgos fisiográficos. Las fechas de divergencia estimadas sugieren que los grupos de Mesoamérica divergieron durante el Plioceno, mientras que los grupos del noroccidente de América del Sur son Pleistocénicos, con un nivel de divergencia genética entre linajes menor que la encontrada entre los grupos mesoamericanos. Los resultados sugieren un origen de *B. asper* en mesoamérica y una especiación alopátrica de las poblaciones de Mesoamérica Caribe. **Palabras clave:** *Bothrops asper*, Región Neotropical, grupo *atrox*, Plioceno, especiación alopátrica.

Introducción

La región Neotropical presenta una historia geomorfológica compleja, estando conformada por cordilleras y serranías de diferente origen geológico (Iturralde-Vinent, 2006; Marshall, 2006). Eventos geológicos y climáticos como la orogénesis de las tierras altas de México y América Central, iniciados desde el Oligoceno hasta el Pleistoceno (Iturralde-Vinent, 2006; Savage, 2002), el levantamiento de la Cordillera de los Andes del Norte (Gregory-Wodzicki, 2000) y la emergencia del Istmo de Panamá (Coates y Obando, 1996) durante el Terciario tardío; además, de los cambios climáticos y de la vegetación (Potts y Behrensmeyer, 1992) y las transgresiones marinas (Haq et al., 1987; Nores, 2004) durante el Plio - Pleistoceno, han sido considerados como factores clave en la diversidad y el patrón de distribución actual de muchos grupos taxonómicos (Whitmore y Prance, 1987; Hughes y Eastwood, 2006; Haffer, 1967; Marshall y Sempere, 1993).

Aunque existen diferencias entre los autores en la edad del cierre definitivo del Istmo de Panamá, la cifra más aceptada es de 3.5 a 3.1 m.a. (Coates et al., 1992; Collins et al., 1996; Anderson, 2001). Este puente intercontinental, permitió la expansión y diversificación de linajes entre continentes, particularmente de especies de gran vagilidad como mamíferos terrestres (Marshall et al., 1982;

Webb y Rancy, 1996). Un aspecto interesante de la biogeografía Neotropical, es la posible dispersión entre América Central y América del Sur, durante periodos de separación marina de múltiples grupos taxonómicos, principalmente anfibios y reptiles (Hanken y Wake, 1982; Estes y Baez, 1985; Vanzolini y Heyer, 1985; Cadle, 1985; Bermingham y Martin, 1998; Weigt et al., 2005; Wang et al., 2008), incluyendo el ancestro de las víboras de fosa que originó al género *Bothrops* (Wüster et al., 2002a). Mediante el uso de cuatro genes mitocondriales Wüster et al. (2002a) sugirieron que América del Sur fue invadida por al menos cuatro linajes independientes de víboras de fosa, *Bothriechis schlegelli*, *Crotalus durissus*, *Porthidium* y el ancestro de *Bothrops*, el cual según los autores presentó una colonización pre-ístmica durante el Mioceno (~10 a 23 m.a) desde América Central hacia América del Sur, lugar en donde se diversificó en los diferentes linajes que hoy conocemos.

El género *Bothrops*, está conformado por 37 especies de serpientes venenosas con una distribución amplia en la región Neotropical, principalmente en América del Sur, al este de la Cordillera Oriental de los Andes del Norte y al sur de la Amazonía (Campbell y Lamar, 2004). Dentro de este género, *B. asper* es la única especie cuyo rango de distribución va desde el norte de América del Sur hasta México en la región de Tamaulipas (Figura 2.1). La distribución geográfica

de *B. asper* comprende principalmente las tierras bajas en los bosques húmedos de Mesoamérica y el norte de América del Sur. *B. asper* presenta una distribución continua desde el sur de México por el Caribe hasta la región del Chocó-Darién en el Pacífico de Colombia. En el Pacífico, se encuentra en las tierras bajas de Chiapas (México) y Guatemala, a lo largo del Pacífico Central y Sur de Costa Rica. En Panamá, *B. asper* presenta una distribución amplia en localidades ubicadas en la región occidental, central y oriental en ambas costas (Pacífico y Caribe) (Campbell y Lamar, 2004), excluyendo las zonas más áridas de la Península de Azuero. En América del Sur, *B. asper* se distribuye principalmente al occidente de la cordillera de los Andes, incluyendo la vertiente Pacífica en Colombia y Ecuador, los valles inter-andinos y la región Caribe en el norte de Colombia (Figura 2.1). Con respecto al origen y dispersión de *B. asper*, solo existe la hipótesis planteada por Parkinson et al. (2002a) y por Gutberlet y Harvey (2004), en la cual sugieren un origen suramericano y una ruta de dispersión sur-norte después de la emergencia del Istmo de Panamá.

Bothrops asper es la serpiente venenosa de mayor importancia epidemiológica en el Neotrópico. Esta especie se caracteriza por su adaptación en ambientes afectados por la urbanización, la deforestación, la contaminación, la agricultura y la ganadería (Cisneros-Heredia y Touzet, 2004; Campbell y Lamar, 2004),

además por su potente veneno con capacidad de infligir mordeduras fatales (Otero et al., 1992; Gutiérrez, 1995; Otero et al., 1996). Por lo anterior, el interés en esta especie se ha centrado en los trabajos que en los diversos campos de la medicina, farmacología y toxicología se han publicado en las dos últimas décadas (> 233 publicaciones en PubMed [National Center for Biotechnical Information]). Por el contrario, el conocimiento sobre la diversidad genética e historia evolutiva de esta especie es muy pobre, en comparación con la producción cada vez mayor de estudios filogenéticos en otras especies de vipéridos (> 21 publicaciones en PubMed, género *Trimeresurus*, Malhotra y Torpe, 2000; género *Crotalus*, Pook et al., 2000; Ashton y de Queiroz, 2001; Wüster et al., 2005a; Douglas et al., 2006; Castoe et al., 2007; género *Lacehesis*, Zamudio y Greene, 1997; género *Agkistrodon*, Parkinson et al., 2002b; género *Atropoides*, Castoe et al., 2003; género *Bothriechis*, Campbell y Smith, 2000; género *Porthidium*, Lamar y Sasa, 2003; Castoe et al., 2005; otras especies del género *Bothrops*, Puerto et al., 2001; Wüster et al., 2005b; Graziotin et al., 2006).

En las dos últimas décadas, seis estudios filogenéticos realizados en diferentes especies de víboras de fosa neotropicales han incluido a *B. asper* en sus análisis (*B. asper* de Belice, Wüster et al., 2002a; Wüster et al., 2002b; y *B. asper* de Costa Rica, Parkinson, 1999; Sasa y Barrantes, 1998; Parkinson et al.,

2002a; Castoe y Parkinson, 2006). En todos los estudios, excepto en Parkinson (1999), los autores sugieren una relación de grupo hermano entre *B. asper* y las especies que conforman el grupo *atrox* (*B. atrox*, *B. marajoensis*, *B. leucurus*, *B. moojeni* y *B. isabelae*), el cual fue definido por Salomão et al. (1997). Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre *B. asper* y el grupo *B. atrox* aún no están bien definidas.

En el contexto de la historia geológica compleja de la región Neotropical y dado que, *B. asper* presenta una distribución amplia en esta región, se llevó a cabo un estudio filogeográfico de las poblaciones de esta especie. Este estudio fue realizado con muestras que representan la mayor parte de su rango de distribución, incluyendo una muestra representativa de las poblaciones de *B. asper* distribuidas en Colombia. Esto constituye un aporte al vacío taxonómico que existe en relación al conocimiento de las relaciones filogenéticas de las víboras de fosa que se distribuyen en este país sudamericano.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman el grupo *atrox* y las poblaciones de *B. asper* procedentes de Mesoamérica y del norte de América del Sur; 2) Determinar si *B. asper* muestra un patrón filogeográfico concordante con la orogénesis de la

región Neotropical; y 3) Establecer el origen y ruta de colonización de *B. asper*, utilizando caracteres moleculares.

Con base en el análisis de características distribucionales, antecedentes históricos sobre la orogénesis del área de distribución de la especie (Coates y Obando, 1996; Gregory - Wodzicki, 2000), de las investigaciones previas sobre el origen del género *Bothrops* y las relaciones filogenéticas entre el grupo *atrox* y *B. asper* (Wüster et al., 2002a; Wüster et al., 2002b), nosotros planteamos las siguientes hipótesis: - Las poblaciones que habitan Mesoamérica constituyen linajes mas derivados que las poblaciones procedentes del noroccidente de América del Sur. - A lo largo de su rango de distribución, *B. asper* presenta alto grado de estructuración poblacional en áreas bordeadas por barreras geográficas. - El tiempo de divergencia entre las distintas poblaciones está en correspondencia con la historia geológica de la región.

La metodología utilizada en este estudio incluyó dos aproximaciones: (1) análisis filogenético entre *B. asper* y las especies que conforman el grupo *atrox* (grupo interno) y, (2) estimación de tiempos de divergencia entre las diferentes poblaciones mediante la calibración con fósiles.

Materiales y Métodos

Especímenes y muestreo

En este estudio fueron muestreados 76 especímenes procedentes de 44 localidades que cubren la mayor parte del rango de distribución de *B. asper* (Apéndice A y Figura 2.1). Sin embargo, las regiones Caribe y Pacífica en Colombia estuvieron limitadas a un pequeño número de muestras por localidad, mientras que muestras del Occidente y Centro de Panamá, Venezuela y Trinidad no pudieron ser obtenidas (Apéndice A). Todas las muestras utilizadas en este estudio provienen de las siguientes instituciones: Serpentario de la Universidad de Antioquia (SUA), Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia (MHUA), Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia (INS), Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica (ICP) y The Amphibian and Reptile Diversity Research Center. En el caso de especímenes vivos mantenidos en cautiverio, la información genealógica de cada individuo fue obtenida de los registros de las colecciones de cada institución, con el fin de evitar incluir en el análisis el mismo linaje mitocondrial más de una vez.

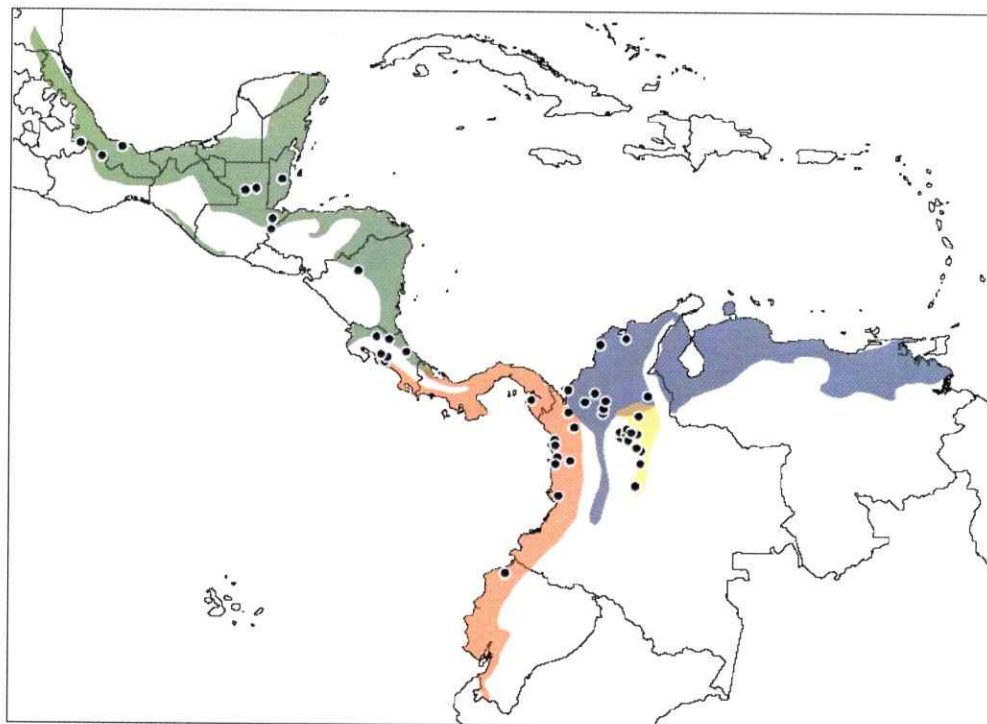


Figura 2.1 Distribución de las muestras de *Bothrops asper* en Mesoamérica y Sur América. El área en color muestra la distribución geográfica basada en Campbell y Lamar (2004). Los puntos representan las localidades de donde los especímenes fueron secuenciados.

Muestras , genes, amplificación y secuenciación

El DNA genómico fue extraído de muestras de tejido (escamas ventrales, hígado, sangre o exhubia) por el método de extracción con sales (Jowett, 1986). En este estudio fueron amplificados dos fragmentos de genes mitocondriales mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): los partidores

utilizados fueron ND4 y LEU (Arévalo et al., 1994) para amplificar un fragmento del gen de la deshidrogenasa, subunidad 4 (NADH 4) y, para el gen del Citocromo b (*Cit b*) fueron usados los partidores Gludg y AtrCB3 (Parkinson et al., 2002a). Para ambos genes, la reacción de PCR se llevó a cabo en un volúmen final de 25 μ L: 2.0 μ L de templado de DNA, 0.4 μ L de cada oligonucleotido (10 μ M), 2.5 μ L de buffer de reacción (10X PCR), 0.25 μ L de mezcla de dNTPs (10mM), 1.0 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0.2 μ L de *Taq* polymerasa (5U/ μ L), y 18.25 μ L de H₂O. El DNA fue inicialmente desnaturalizado a 94°C por 5 min y luego fueron corridos 38 ciclos de amplificación, con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 40 s, 54°C de alineamiento por 40 s, y 72°C de elongación por 1 min, seguido por una elongación final de 5 min a 72°C. Para verificar el tamaño del producto, éste fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1.0% teñidos con bromuro de etidio. El producto amplificado fue purificado mediante el Kit Qiaquick (Qiagen®) y secuenciado en ambas direcciones usando el secuenciador automático ABI3730XL (Macrogen).

Selección de los grupos interno y externo

En este estudio fueron incluidas 11 secuencias correspondientes a las especies que conforman el grupo *atrox* (**Anexo 1**; cinco secuencias publicadas en

el GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>, y seis obtenidas en este estudio) como parte del grupo interno, debido a que las relaciones filogenéticas entre el grupo *atrox* y *B. asper* aún no están definidas y los antecedentes no permiten considerar a *B. asper* como un grupo monofilético. Dado que en los análisis con datos moleculares un muestreo adecuado es un factor importante (Linder et al., 2005), en este estudio se utilizaron 13 taxa como grupos externos, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios filogenéticos realizados en víboras de fosa. Los grupos externos fueron: *Bothrocophias hyoprora* y *B. microphthalmus* como grupo hermano de los *Bothropoides* sur americanos (*Bothrops alternatus*, *B. ammodytoides*, *B. insularis*, *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. venezuelensis*, *B. colombiensis*, *Bothriopsis bilineata*, *Bothriopsis taeniata*. Wüster et al., 2002b; Castoe y Parkinson, 2006) y secuencias de *Bothrops* de las Antillas Menores (*B. caribbaeus* y *B. lanceolatus*) como taxa hermanas del grupo *B. asper - atrox* (Wüster et al., 2002b).

Exploración de los datos

Las secuencias de las hebras pesada y liviana de DNA fueron editadas en el programa BioEdit versión 7.0 (Hall, 1999) y alineadas manualmente en el programa GeneDoc (Nicholas y Nicholas, 1997). Con el fin de comprobar el

origen mitocondrial de las secuencias de DNA obtenidas en este estudio, las secuencias fueron analizadas de acuerdo a la metodología propuesta por Triant y DeWoody (2007), en la cual se consideró lo siguiente: a) el origen del DNA mitocondrial, que para este estudio fue obtenido de múltiples tipos de tejido (sangre, músculo, piel, escamas ventrales y exhubia), debido a que los partidores pueden amplificar DNA mitocondrial en un tipo de tejido pero inserciones nucleares de secuencias mitocondriales en otro; b) el alineamiento con secuencias de especies relacionadas filogenéticamente como *Gloydius shedaoensis* y con una relación más lejana como *Iguana iguana*; c) la traducción a proteínas con un marco de lectura completo para descartar la presencia de inserciones, deleciones (indels), codones de termino que quizás indiquen la amplificación de inserciones nucleares en el genoma mitocondrial (*numts*); d) el patrón de sustitución típico de genes mitocondriales, con tasas altas de transición /transversión; e) la distancia genética p , para corroborar que las distancias obtenidas se encuentran dentro de los rangos establecidos para el nivel de especie y finalmente, e) se evaluó el índice de saturación en las secuencias. Para ello se comparó el índice de saturación esperado (asumiendo saturación) con el índice de saturación observado en el programa DAMBE4.5.27 (Xia, 2001).

A partir de las secuencias alineadas se analizó la composición nucleotídica en porcentaje (%) para cada una de las bases A, T, C y G en el programa Dambe*. Además, mediante el programa DnaSp versión 4.10 (Rozas et al., 2003) se calculó el nivel de diversidad haplotípica (H), y el número de sitios polimórficos (S) para cada linaje obtenido en el análisis filogenético (Ver resultados de la filogenia).

Análisis filogenético

El análisis filogenético de los datos fue realizado mediante los métodos de Máxima Parsimonia (MP), Maximum Likelihood (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Para comprobar si los fragmentos de DNA mitocondrial utilizados en este estudio son congruentes filogenéticamente y por tanto si pueden ser combinados para realizar una filogenia, fue utilizada la prueba de Diferencia de la Longitud por Incongruencia (ILD, (Farris et al., 1995; *Incongruence Length Difference*). La prueba ILD está integrado en PAUP * versión 4.0b10 (Swofford, 2003) como prueba de Partición de Homogeneidad y está basado en métodos de máxima parsimonia. El principio de esta prueba es que si existe incongruencia filogenética entre los diferentes conjuntos de datos (particiones), la longitud de los árboles será menor cuando se conservan los caracteres en las particiones

originales que cuando están repartidos de manera aleatoria. El programa inicialmente determina las longitudes de los árboles más cortos para cada conjunto de datos por separado y luego produce una suma de sus longitudes. Posteriormente, los datos de los diferentes conjuntos son combinados y se hacen particiones al azar en conjuntos de datos de la misma longitud que el original. La suma de las longitudes de los árboles de los conjuntos de datos originales es comparada con la de aquellos obtenidos a partir de los conjuntos de datos obtenidos de forma aleatoria. Se parte de la hipótesis nula que los conjuntos de datos explican la misma historia evolutiva y por tanto que ambas particiones comparten la misma distribución. Existe incongruencia evolutiva y por tanto se rechaza la hipótesis nula cuando encontramos una probabilidad baja, indicando que ambas particiones pertenecen a distintas distribuciones de datos ($p \leq 0,05$). De esta manera interpretaremos que la evolución de cada uno de los conjuntos de datos es diferente (Barker y Lutzoni, 2002).

Los análisis de MP fueron ejecutados en el programa PAUP* versión 4.0b10. En todos los casos los caracteres se trataron como no ordenados y se les asignó igual peso siguiendo a Broughton et al. (2000). Las búsquedas heurísticas fueron conducidas con el algoritmo de "barrido de ramas" por "bisección y reconexión del árbol" (TBR) con adición aleatoria de taxa al árbol inicial (100 réplicas). Para

comprobar la robustez de cada nodo obtenido en el árbol filogenético, se hizo un análisis de "bootstrap" no paramétrico (Felsenstein,1985) con la exclusión de caracteres no informativos usando 1000 réplicas. Los valores de "bootstrap" son interpretados como un estimativo relativo del soporte de los clados para un conjunto de datos particular, pero no equivalentes a probabilidades estadísticas (Efron et al., 1996). Para aceptar un nodo como respaldado desde el punto de vista del bootstrap se seguirá la sugerencia de valores por sobre el 70%, los que corresponden a la probabilidad de 0.05, de acuerdo a Hillis y Bull (1993).

En este estudio se hicieron particiones de los datos para cada gen, debido a que actualmente, hay evidencia que los modelos complejos de evolución de secuencias pueden extraer señales filogenéticas adicionales de los datos, especialmente donde la saturación en la sustitución de pares de bases es común (Castoe et al., 2004, 2005; Castoe y Parkinson, 2006). Por consiguiente, en los análisis fueron utilizados diferentes modelos de evolución de secuencias para particiones biológicamente relevantes de los datos. En el caso de genes mitocondriales que codifican para proteínas, las particiones más relevantes son la primera, la segunda y la tercera posición del codón, las cuales presentan patrones diferentes de evolución de secuencias (Wüster et al., 2007). El programa MrModeltest version 2.2 (Nylander, 2004) fue usado para seleccionar

el modelo de evolución de secuencias más apropiado para cada partición de datos. Este programa considera solamente los modelos de sustitución nucleotídica que están disponibles actualmente en MrBayes v3.04b (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Los modelos se seleccionaron de acuerdo al criterio de información *Akaike* (Bos y Posada, 2005).

Los análisis de ML fueron realizados en TREEFINDER version de Abril 2008 (Jobb, 2008). Los siguientes parámetros fueron implementados para cada partición de los datos: 1Cytb = HKY [Optimum, Empirical]: GI [Optimum]: 5, 2Cytb = HKY [Optimum,Empirical]: I [Optimum]: 5, 3Cytb= GTR [Optimum,Empirical]: G [Optimum]: 5, 1ND4 = HKY [Optimum, Empirical]: G [Optimum]: 5, 2ND4= GTR [Optimum, Empirical]: G [Optimum]: 5, 3ND4= HKY [Optimum,Empirical]: G[Optimum]: 5. Adicionalmente, en este mismo programa, se estimó la mayor tasa de sustitución para cada partición de los datos. Finalmente, se realizó un "bootstrap" no paramétrico de 200 replicas, para estimar la robustez de la reconstrucción filogenética con los mismos modelos descritos anteriormente.

El análisis de IB fue realizado en el programa MrBayes versión 3.0B4 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Cada simulación de cadenas de Markov utilizando el método de Montecarlo (MCMC) fue hecho por duplicado, se

corrieron 5.0×10^6 generaciones con cuatro cadenas de Markov (una fría y tres calientes). Los parámetros entre particiones fueron separados (cada partición tiene su propio conjunto de parámetros) y se asumió que las particiones evolucionan bajo diferentes tasas, usando el comando *ratepr = variable*. Los métodos MCMC dependen de la convergencia de las cadenas de Markov en su distribución estacionaria. Una vez que se estabilizaron los valores de probabilidad a posteriori de la cadena de Markov, se descartaron las muestras iniciales previas a la estabilización de la probabilidad (*burn in* = 2.0×10^6 generaciones). A partir de este punto los árboles fueron muestreados cada 1000 generaciones. Se computó el consenso de mayoría (50%) incluyendo componentes combinables e información sobre largo de las ramas, para todos los árboles muestreados posterior a la estacionalidad de las búsquedas. Nodos retenidos en al menos 95% de las muestras (i.e. probabilidades posteriores) se consideraron bien soportados.

Estimación de los tiempos de divergencia

Para estimar el tiempo de los eventos cladogenéticos dentro del clado *B. asper-B. atrox*, se utilizó un método de reloj molecular "relajado" que incorpora la tasa de heterogeneidad basado en la estadística bayesiana. Este método

permite el uso simultáneo de diferentes parámetros evolutivos para cada conjunto de datos (Thorne et al., 1998; Thorne y Kishino, 2002), además, la utilización de diferentes puntos de calibración en el árbol filogenético creando así lo que se conoce como relojes locales (Yorder y Yang, 2000) para cada punto de calibración. Este análisis fue realizado en el programa Multidistribute (módulos PALM / multidivtime, Thorne et al., 1998; Thorne y Kishino, 2002) y se realizó siguiendo el protocolo de Rutschmann (2004). Este método de datación basado en la estadística bayesiana, utiliza modelos probabilísticos para describir los cambios en la tasa evolutiva a través del tiempo, utilizando el procedimiento de cadenas de Markov (MCMC) para calcular a posteriori la distribución de las tasas evolutivas y los tiempos de divergencia de cada nodo del árbol.

En este análisis se utilizó un árbol bayesiano con 70 secuencias, entre las cuales se incluyeron linajes de Norte América, que fueron usados como puntos de calibración, pues tienen un registro fósil publicado: el origen de *Sistrurus* a 9 ma. (Parmley y Holman, 2007), el origen de *Agkistrodon piscivorus* a 4.7 ma (Holman, 2000), y el tiempo de divergencia estimado para *Crotalus atrox/ruber*, el cual fue de 2.9 a 3.5 ma (Castoe et al., 2007) como límite inferior (L) y límite superior de la edad del nodo, respectivamente.

Los datos moleculares fueron particionados por gen (dos particiones) para todos los análisis. Los parámetros evolutivos del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustan a los datos fueron estimados usando el modelo F84+Γ para cada partición (Felsenstein, 1984; diferentes frecuencias nucleotídicas, diferencia ts/tv, heterogeneidad evolutiva entre sitios). La longitud de los brazos y la matriz de varianza covarianza fueron estimados para el árbol obtenido en el análisis bayesiano, usando el programa *baseml* (PALM; Yang, 1997). El análisis bayesiano MCMC de 10.000 ciclos (muestreados cada 100 ciclos) seguido de un *burn in* de 100.000 ciclos, fue realizado en el programa *multidivtime* (Thorne y Kishino, 2002) para calcular la distribución a posteriori de las tasas evolutivas de los nodos y de cada una de las ramas y los tiempos de divergencia entre los taxa (Kishino et al., 2001; Thorne y Kishino, 2002).

Prueba de Mantel

La acumulación de variación genética con un incremento de la distancia geográfica, fue evaluada mediante la asociación entre matrices de distancia genética (JC69) y distancia geográfica (distancia Euclidiana, datos de latitud y longitud) entre individuos. Este análisis se evaluó con la prueba de Mantel,

utilizando 10.000 permutaciones aleatorias con el programa Zt (Bonnet and Van de Peer, 2002).

Resultados

Variación de las secuencias

En este estudio se obtuvieron secuencias de DNA para los genes *Citb* y *ND4* de 76 *B. asper*, 1 *B. colombiensis*, 1 *B. venezuelensis*, 2 *B. atrox* y 2 *B. isabellae*. El alineamiento no fue ambiguo y las secuencias de aminoácidos inferida no mostraron codones de término, lo cual sugiere un origen mitocondrial de las secuencias más que inserciones nucleares (Zhang y Hewitt, 1996). El análisis ILD no fue significativo ($p = 0.54$), lo cual permitió combinar las secuencias. El alineamiento final de los genes concatenados fue de 1322 pares de bases, 696 de *Cit b* y 626 de *ND4*. Entre los taxa que conformaron el grupo interno (*B. asper* y *B. atrox*) se contabilizaron 188 sitios informativos para parsimonia .

Análisis filogenético

Los modelos de evolución de secuencias seleccionados como óptimos por el criterio de información *Akaike* (programa MrModeltest) para todos los datos y para las seis particiones usadas en este estudio son mostrados en la **Tabla 2.1**.

Estos modelos fueron asignados a cada partición de los datos en los análisis de ML e IB.

Gen	PC	Modelo	Frec_A	Frec_C	Frec_G	Frec_T	Pinvar	PFG
<i>Cit b + ND4</i>		GTR+I+ Γ	0.3132	0.3437	0.0993	0.2438	0.4729	0.9746
Cit b	1	HKY+I+ Γ	0.3365	0.2591	0.1725	0.2318	0.4079	0.4493
	2	HKY+I	0.2019	0.2692	0.1301	0.3988	0.8464	0.0000
	3	GTR+ Γ	0.3165	0.4721	0.0405	0.1709	0.0000	2.0482
ND4	1	HKY+ Γ	0.3441	0.2885	0.1609	0.2065	0.0000	0.2592
	2	GTR+ Γ	0.1679	0.3101	0.1347	0.3874	0.0000	0.1617
	3	HKY+ Γ	0.4238	0.3695	0.0924	0.1142	0.0000	1.8892

Tabla 2.1. Modelos de Evolución de las secuencias seleccionados por el criterio *Akaike*. Se muestran los resultados para todos los datos y las seis particiones utilizadas en el análisis de IB. Abreviaturas: PC, Posición del Codón; Frec, Frecuencia; Pinvar, Proporción de sitios invariables ; PFG, Parámetro de la forma Gamma .

Las relaciones filogenéticas estimadas entre especies y entre los grupos de *B. asper* asignados por regiones geográficas fueron congruentes en los métodos de ML e IB. El árbol de consenso de mayoría obtenido mediante el análisis de MP mostró diferencias con respecto a la ubicación de algunos nodos de especies distintas a *B. asper*, principalmente el nodo correspondiente a las especies del grupo *atrox* (nodo B, Tabla 2.2, Figuras 2.2 y 2.3). Sin embargo los tres métodos filogenéticos produjeron árboles con la misma topología y soporte estadístico similar (valores de bootstrap y/o probabilidad a posteriori) para los grupos

conformados por los diferentes individuos de *B. asper* analizados, excepto para los linajes 1 y 2.

El análisis de parsimonia produjo 100 árboles con el mismo valor de parsimonia, con una longitud de 1179 pasos, un índice de consistencia de 0.4080 y un índice de retención de 0.7918. Estos árboles mostraron diferencias únicamente en la posición de los taxa terminales dentro de cada grupo. En la **Tabla 2.2**, se describen los nodos que corresponden a los grupos encontrados para los individuos de *B. asper*. Es importante mencionar, que los nombres de los grupos fueron dados de acuerdo con la región fisiográfica a la cual pertenecen. Mesoamérica se extiende de norte a sur desde el Istmo de Tehuantepec (México) hasta las tierras bajas del Darién en Panamá. Esta región es dividida a su vez por la Depresión de Nicaragua en América Central Nuclear (ACN) y América Central Istmica (ACI). La región de ACN se extiende desde el sur de México al norte de Nicaragua y la región de ACI va desde el sur de Nicaragua hasta Panamá, la cual incluye la región Pacífica y Atlántica (Campbell y Lamar, 2004). En el norte de América del Sur, los grupos fueron nombrados de acuerdo con la ubicación en las vertientes o valles originados por las tres cordilleras que constituyen los Andes del Norte (Cordillera Occidental, Cordillera Central y Cordillera Oriental).

Los árboles obtenidos por los tres métodos de inferencia filogenética, presentaron las siguientes características (Figuras 2.2 y 2.3). La filogenia inferida en los tres métodos utilizados, presentó un soporte estadístico alto a la relación de grupo hermano entre las *Bothrops* de las Antillas con el grupo conformado por *B. asper* y las especies del grupo *B. atrox* (*B. atrox*, *B. marajoensis*, *B. leucurus*, *B. moojeni* y *B. isabelae*) [100, 97, Soporte Bootstrap (SB: MP, ML)/1.00 Probabilidad a Posteriori (IB: PP)]. Con respecto al grupo interno (individuos de *B. asper* y especies del grupo *atrox*), el análisis filogenético recuperó una politomía de tres linajes divergentes con un soporte estadístico alto, representados en las Figuras 2.2 y 2.3 por los Nodos: B, E y L. El nodo B esta conformado por las especies que han sido asignadas al grupo *atrox* (98, 100 SB/ 1.00 PP). Este resultado soportó la monofilia de este grupo, pero no permitió establecer su relación filogenética con los individuos de *B. asper* analizados (52, 81 SB / 0.95 PP)

El nodo E contiene a los individuos de *B. asper* procedentes de localidades de la región Caribe de Mesoamérica y está a su vez dividido en dos linajes (1 y 2) con un alto soporte estadístico (94, 100 SB / 1.00 PP): el primer linaje nombrado como América Central Istmica, región Caribe (ACIC), el cual esta conformado

Nodo	Descripción del nodo	Análisis Filogenético		
		Soporte		
		MP	ML	IB
A	<i>Bothrops</i> de las Antillas: grupo hermano del grupo <i>atrox</i> y <i>B. asper</i>	100	97	1.00
B	Grupo <i>atrox</i>	98	100	1.00
C	Linaje 1: <i>B. asper</i> de América Central Istmica, región Caribe	100	100	1.00
D	Linaje 2: <i>B. asper</i> de México y América Central Nuclear	56*	84	1.00
E	<i>B. asper</i> Mesoamérica, región Caribe (C+D)	94	100	1.00
F	Linaje 3: <i>B. asper</i> Costa Rica (región Pacífica)	100	79	0.98
G	Linaje 4: <i>B. asper</i> Panamá (Darién) y Colombia (región Pacífica)	98	100	1.00
H	Linaje 5: <i>B. asper</i> Colombia (región Caribe)	100	100	1.00
I	Linaje 6: <i>B. asper</i> Colombia (Valle del Magdalena)	94	100	1.00
J	Monofilia de <i>B. asper</i> región Caribe y Valle del Magdalena	99	100	1.00
K	Relación filogenética entre los linajes 3 y 4 (F+G)	*	39*	0.53*
L	Monofilia de <i>B. asper</i> del Pacífico de Costa Rica, Panamá y Colombia (F+G+H+I)	68*	100	1.00
M	Posición filogenética del grupo <i>atrox</i> con respecto a los diferentes linajes de <i>B. asper</i>	52*	81	0.95
N	Posición filogenética de <i>B. asper</i> de Mesoamérica Caribe con respecto a los otros linajes	68*	*	*

Tabla 2.2. Descripción de los nodos y linajes indicados en las Figuras 2.2 y 2.3. El asterisco (*) indica los nodos no soportados.

por individuos procedentes de Metagalpa (Nicaragua), San Carlos, Sarapiquí y Monteverde (Costa Rica); y el segundo linaje nombrado como México y América Central Nuclear (MACN), el cual incluye localidades en México (Oaxaca y Veracruz), Belice, Guatemala (Izabal, Petén) y Honduras (Copán).

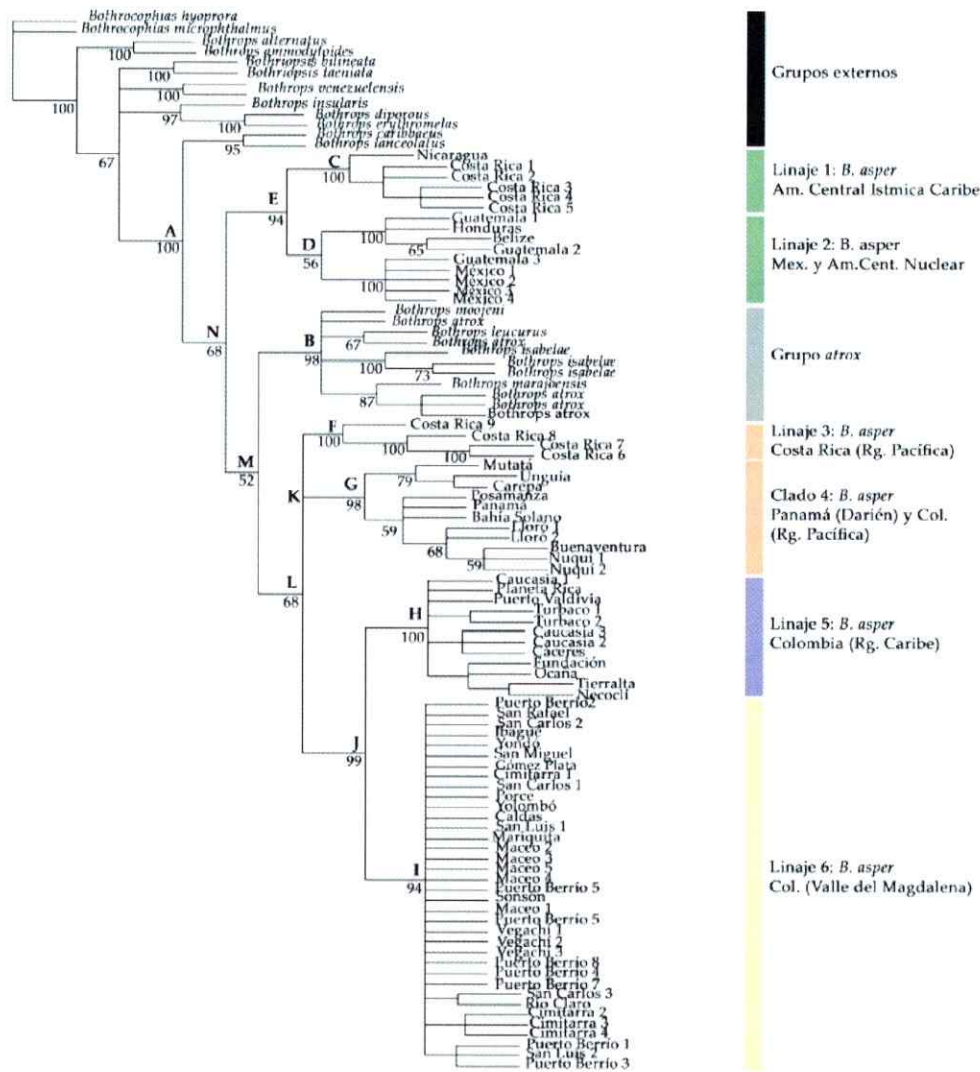
Dentro del nodo L (68, 100 SB / 1.00 PP), se encontró una politomía de tres linajes conformados por individuos procedentes de localidades ubicadas en la región Pacífica de Costa Rica [linaje 3; nodo F (CRP): Alajuela y San José en Costa Rica]; linaje 4 (nodo G) conformado por las localidades del Darién en el oriente de Panamá y localidades ubicadas en la región Pacífica colombiana. Además el nodo J, conformado por los grupos que contienen las muestras de la región Caribe en Colombia (linaje 5; nodo H) y el Valle del Magdalena (linaje 6; nodo I). Este resultado permitió establecer que los individuos de *B. asper* de América Central Istmica Caribe constituyen un linaje distinto de las poblaciones de América Central Istmica, Pacífico (Costa Rica), sugiriendo eventos de colonización independiente de ambas costas de América Central.

Con respecto a los grupos de *B. asper* de Colombia, los resultados del análisis filogenético mostraron tres linajes con un soporte estadístico alto: linaje 4: nodo G (Vertiente Pacífica- Ecoregión Chocó-Darién; 98, 100 SB / 1.00 PP), incluye las localidades ubicadas al oeste de la Cordillera Occidental de los Andes (localidades: Darién, Carepa, Unguía, Mutatá, Posamanza, Bahía Solano, Lloró, Buenaventura y Nuquí); nodo H linaje 5 (región Caribe de Colombia: 100, 100 SB / 1.00 PP), incluye las localidades ubicadas en el área conformadas por las planicies de los valles de los ríos Cauca, Magdalena, Sinú y San Jorge

(Localidades: Fundación, Tierralta, Ocaña, Puerto Valdivia, Caucasia, Planeta Rica, Cáceres, Necoclí y Turbaco); nodo I, linaje 6 (Valle del Magdalena; 94,100 SB / 1.00 PP), incluye las localidades ubicadas en el Valle formado por las vertiente este y oeste de las cordilleras Central y Occidental de los Andes, respectivamente (Localidades: Ibagué, Yolombó, Porce, Gómez Plata, Vegachí, Sonsón, Maceo, Puerto Berrío, San Luis, San Carlos, San Miguel, Río Claro, Mariquita, La Victoria, Cimitarra y Yondó). Cabe mencionar que los grupos de la región Caribe de Colombia y del Valle del Magdalena conformaron un grupo monofilético (99, 100 SB / 1.00 PP). Sin embargo, los resultados no permitieron establecer un respaldo estadístico de la posición filogenética del linaje 4 (región Pacífica; *, 39 SB/ 0.53 PP).

Composición nucleotídica e índice de diversidad haplotípica

La composición nucleotídica para el total de las secuencias fue de 29.2% de A, 31.2% de C, 11.9% de G y 27.8% de T. El análisis de polimorfismos fue realizado para todos los individuos y para los grupos obtenidos en el análisis



10

Figura 2.2. Árbol de consenso de mayoría de 100 árboles con el mismo valor de parsimonia (1179 pasos). Este árbol fue obtenido mediante el método de búsqueda heurística con las secuencias combinadas de los genes *Cit b* y ND4. El valor bootstrap de robustez es indicado bajo cada rama (los valores por debajo del 50% no son indicados). Las letras mayúsculas señalan los nodos descritos en la **Tabla 2.2**.

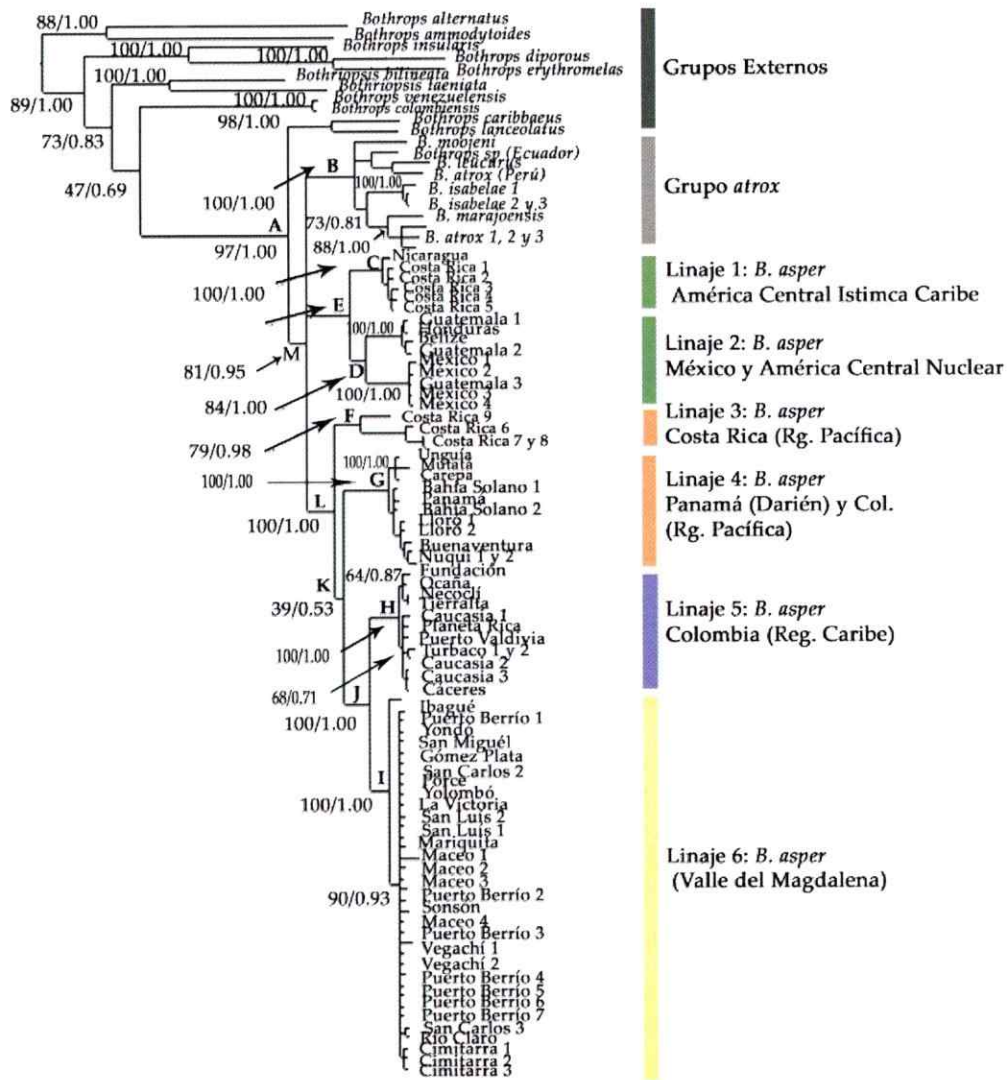


Figura 2.3. Árbol filogenético inferido del análisis de Máxima Likelihood y análisis Bayesiano con diferentes modelos para cada partición de los datos (Tabla 2.1). El soporte bootstrap (izquierda) y probabilidad a posteriori (derecha) son indicadas próximas a los nodos. Las letras mayúsculas señalan los nodos descritos en la Tabla 2.2.

filogenético. En la muestra total constituida por 68 secuencias del gen del *Cyt b*, fueron encontrados 30 haplotipos y una diversidad haplotípica alta ($H = 0.870 \pm 0.038$). Los haplotipos fueron definidos por 76 sitios polimórficos y 78 mutaciones. En el análisis de polimorfismos de los grupos obtenidos en el análisis filogenético, el valor más alto en cuanto a diversidad haplotípica lo presentó el grupo de México América Central Nuclear (linaje 2; $H = 0.972 \pm 0.064$). La diversidad haplotípica más baja la presentó el grupo del Valle del Magdalena (linaje 6; $H = 0.214 \pm 0.103$). Los valores de los índices de diversidad haplotípica para los otros linajes fueron: linaje 1, $H = 0.93 \pm 0.12$; linaje 3, $H = 0.67 \pm 0.31$; linaje 4, $H = 0.91 \pm 0.07$; linaje 5, $H = 0.86 \pm 0.08$).

Estimación de tiempos de divergencia

Los resultados del análisis del método de reloj molecular "relajado" basado en la estadística Bayesiana son mostrados en la **Figura 2.4**. Para cada nodo encontrado en el árbol se obtuvo un tiempo en millones de años (m.a.), desviación estándar e intervalo de confianza del 95%. Se dataron los nodos del árbol de Inferencia Bayesiana con $PP \geq 95$. Aunque los límites de confianza al 95% son amplios, los resultados del análisis mostraron que el tiempo de divergencia entre las *Bothrops* de las Antillas (grupo hermano) con los grupos de

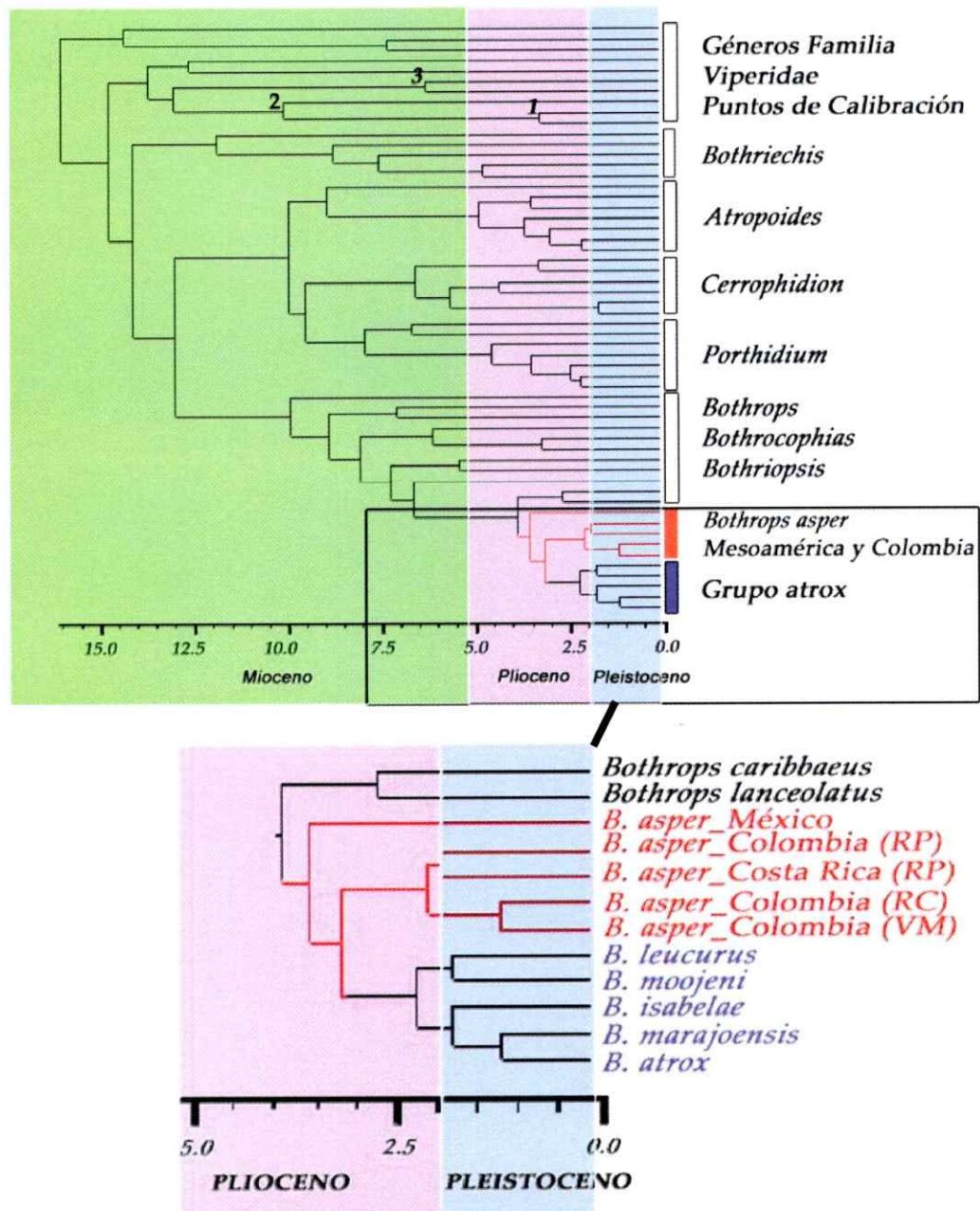


Figura 2.4. Árbol Bayesiano que muestra los tiempos de divergencia entre los diferentes grupos de *B. asper*, el grupo *atrox* y las *Bothrops* de las Antillas menores. Puntos de calibración: 1: *Crotalus atrox* / *C. ruber*. 2: *Sistrurus*. 3: *Agkistrodon*.

B. asper analizados y el grupo *atrox* ocurrió durante el Plioceno [3.8 ± 0.6 m.a. (2.7 m.a. a 5.0 m.a)].

Con respecto a los grupos de *B. asper*, el grupo de Mesomérica región Caribe (linajes 1 y 2) habrían divergido de los grupos de Mesoamérica Pacífico (linaje 3) y los del nor-occidente de América del Sur (linajes 4, 5 y 6) también durante el Plioceno [3.4 ± 0.5 m.a (2.4 a 4.6 m.a)]. La divergencia entre el linaje 3 (América Central Ístmica, región Pacífica) y 4 (Vertiente Pacífica de Colombia y oriente de Panamá) con los linajes 5 (región Caribe de Colombia y 6 (Valle del Magdalena) ocurrió posiblemente a finales del Plioceno – principios del Pleistoceno [2.0 ± 0.4 m.a. (1.3 a 2.8m.a)].

Distancia genética dentro y entre grupos

El promedio de la distancia p no corregida entre grupos y dentro de los grupos de *B. asper* son presentados en la **Tabla 2.3**. El nivel de divergencia genética promedio entre los grupos varió desde 1.8 ± 0.8 % entre los grupos del Valle del Magdalena y la Región Caribe de Colombia , a 7.9 ± 1.6 % entre los grupos de México y América Central Nuclear y la Región Caribe de Colombia. Es importante mencionar que la distancia genética p entre el grupo hermano (*Bothrops* de las Antillas) y los grupos de México y América Central Nuclear (5.9

$\pm 1.1 \%$) y América Central Istmica Caribe ($4.7 \pm 1.2 \%$) son menores que las distancias entre estos últimos grupos con los grupos de América Central Istmica región Pacífica y Colombia (Tabla 2.3). Dentro de los grupos analizados de *B. asper*, México y América Central nuclear fue el que presentó mayor divergencia genética ($1.9 \pm 0.7\%$) y el Valle del Magdalena fue el grupo que presentó una menor divergencia (0.1%), lo cual es congruente con los índices de diversidad haplotípica.

Linajes	Dentro de linajes	Entre grupos							
		BA	Ga	1	2	3	4	5	6
<i>Bothrops Ant.</i>	0.039 [0.012]		0.009	0.012	0.011	0.012	0.012	0.013	0.013
Grupo <i>atrox</i>	0.026 [0.006]	0.042		0.012	0.012	0.012	0.009	0.013	0.012
1 ACIC	0.001 [0.001]	0.046	0.047		0.011	0.015	0.014	0.015	0.015
2 MACN	0.019 [0.007]	0.050	0.059	0.040		0.014	0.014	0.016	0.015
3 PCR	0.003 [0.003]	0.053	0.050	0.063	0.066		0.011	0.013	0.012
4 PC y Panamá	0.003 [0.002]	0.045	0.034	0.049	0.057	0.037		0.013	0.010
5 RCC	0.006 [0.003]	0.063	0.061	0.062	0.079	0.045	0.048		0.008
6 VM	0.001 [0.000]	0.054	0.052	0.053	0.065	0.036	0.030	0.018	

Tabla 2.3. Medidas de la divergencia genética neta dentro y entre los grupos de *B. asper* obtenidos en el análisis filogenético. Los promedios de las distancias p no corregida, están indicados bajo la diagonal. Sobre la diagonal son indicados los errores estándar calculados de 1000 replicas. BA: *Bothrops* Antillas. Ga: Grupo *atrox*.

Prueba de Mantel

La prueba de Mantel mostró una correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica ($r = 0.84$, $p = 0.0001$), mostrando un patrón de aislamiento por distancia lo cual podría explicar la estructuración genética en áreas en donde no hay una barrera ecogeográfica presente (Figura 2.5).

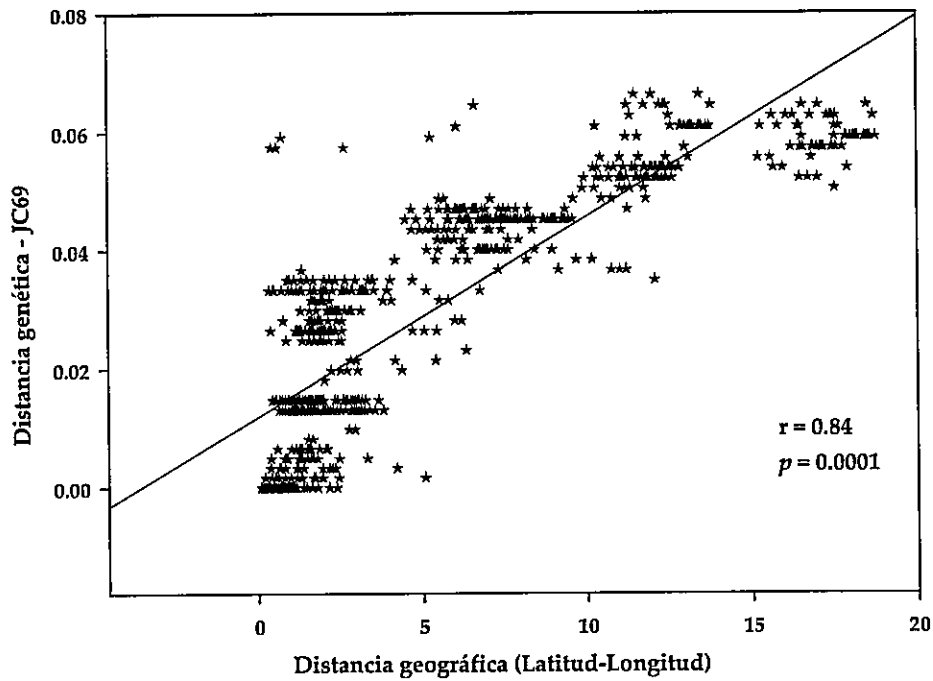


Figura 2.5. Correlación entre distancia genética (JC69) y distancia geográfica (Euclidiana) entre localidades muestreadas de *Bothrops asper*.

Discusión

Relaciones filogenéticas entre el grupo atrox y las poblaciones de B. asper

Dentro de la historia taxonómica de *B. asper*, los trabajos de Wüster et al. (2002b) y Parkinson et al. (2002a) sugirieron la relación de grupo hermano entre las especies que conforman el grupo *atrox* y *B. asper*. La filogenia interespecífica obtenida en este estudio con dos genes mitocondriales soportó la monofilia del grupo *atrox*, conformado por las especies *B. atrox*, *B. isabelae*, *B. leucurus*, *B. moojeni* y *B. marajoensis* (*sensu* Salomão et al., 1997) procedentes de diversas localidades de Colombia, Venezuela, Brasil, Perú y Ecuador. Estos resultados no permitieron establecer la posición filogenética de este grupo en relación con las poblaciones de *B. asper* de Mesoamérica y del noroccidente de América del Sur, y consecuentemente la monofilia de las poblaciones de *B. asper* no pudo ser establecida.

La politomía encontrada en este estudio entre el grupo *atrox* y *B. asper*, podría ser resuelta con la incorporación de otros genes como la región control y genes nucleares. Con respecto a los genes nucleares, varios estudios en aves (Eberhard y Bermingham, 2004), mamíferos (Matthee et al., 2001; Matthee et al., 2004; Matthee y Davis, 2001; Willows-Munro et al., 2005) y reptiles (Sanders y Lee, 2007; Sanders et al., 2008), han encontrado filogenias más robustas al

incorporar este tipo de marcadores en sus análisis. Estos estudios han demostrado que los marcadores nucleares presentan niveles bajos de homoplasia y son útiles para recuperar información de grupos taxonómicos que han experimentado eventos de radiación adaptativa rápida, como el ancestro del género *Bothriopsis* (Wüster et al., 2002a). Además, se hace necesario la incorporación de nuevas localidades que comprendan un mayor rango de distribución del grupo *atrox* y de *B. asper*, principalmente muestras procedentes de Panamá, Venezuela, Ecuador y Brasil.

Concordancia entre la estructura filogeográfica de B. asper con atributos biogeográficos.

El análisis filogenético entre los grupos de *B. asper*, recuperó seis linajes con un alto nivel de estructuración genética, los cuales mostraron correspondencia con los atributos fisiográficos presentes en la región Neotropical (Figura 2.6). La distribución de *B. asper* dentro de esta región comprende diversas barreras ecogeográficas potenciales: La Depresión de Nicaragua, la Cordillera de los Andes en el nor-occidente de América del Sur, las cadenas montañosas de Mesoamérica y los bosques áridos en la Provincia de Guanacaste (Costa Rica), península de Azuero (Panamá) y la Península de la Guajira (Colombia). Las

poblaciones de *B. asper* que conforman los linajes 1 y 2 posiblemente estuvieron separados por la Depresión de Nicaragua. Esta región separa dos masas de tierras altas, las tierras altas del bloque Chortis al norte (Honduras y Nicaragua), y las tierras altas de la porción baja de América Central (Costa Rica y Panamá). La evidencia geológica sugiere que existió una separación marina entre las tierras altas de Chortis y la porción baja de América Central durante el Mioceno y la mayor parte del Plioceno (Coates y Obando, 1996; Iturralde-Vinent, 2006). La Depresión de Nicaragua ha sido identificada como una de las mayores causas de separación filogeográfica para taxa como ranas (Savage, 1987; Duellman , 1999), Salamandras (Parra-Olea et al., 2004), serpientes (Savage, 1982; Cadle, 1985), plantas, insectos y peces (Marshall y Liebherr, 2000; Halas et al., 2005).

Los linajes de Mesoamérica Caribe (linajes 1 y 2) y el linaje correspondiente al Pacífico de Costa Rica (linaje 3) están separados por cordilleras con alturas aproximadas entre 1000 y 2000 m (Cordilleras de Guanacaste, Central y Talamanca en Costa Rica). Estudios realizados en diversos organismos (anfibios: García-París et al., 2000; reptiles: Zamudio y Greene ,1997; Parkinson et al., 2000; peces de agua dulce: Bermingham y Martín, 1998; Mamíferos: Demastes et al., 1996; Cropp y Boinski, 2000; Harris et al., 2000; árboles: Cavers et al., 2003;

Novick et al., 2003), han demostrado que el patrón filogeográfico de estos taxa dentro de Mesoamérica ha sido fuertemente influenciado por la historia geológica compleja de esta región, por los cambios cíclicos en el clima, la vegetación y el nivel del mar, además de los constantes procesos orogénicos.

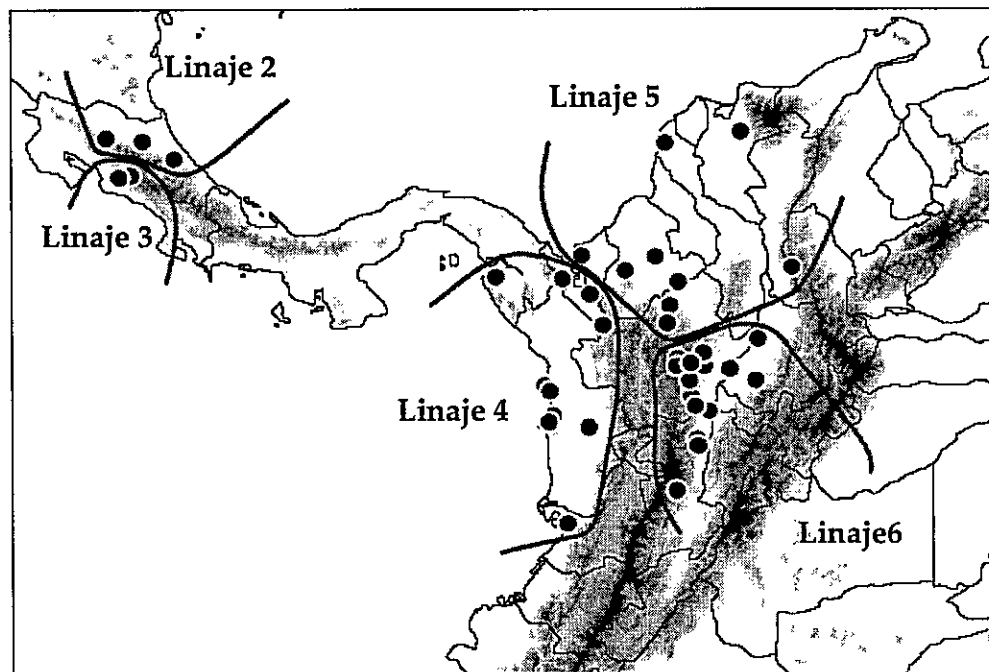


Figura 2.6. Estructura filogeográfica de *Bothrops asper* basada en los genes mitocondriales *Citocromo b* y *ND4*. El nombre de cada linaje esta dado en las Figuras 2.2 y 2.3.

Según la historia geológica de América Central, el levantamiento del rango montañoso de la porción baja de esta región fisiográfica (incluyendo la

cordillera de Talamanca) ocurrió desde el Mioceno tardío a inicios del Plioceno (8-5 m.a.) y culminó en el Plioceno con el cierre del portal de Panamá (Ferrusquia-Villafranca, 1978, *sensu* Hasbún et al., 2005; Coates y Obando, 1996). Nuestros datos moleculares son consistentes con la hipótesis que las poblaciones de *B. asper* que habitan en el Pacífico y Caribe de Costa Rica, divergieron durante el Plioceno y su diferenciación coincide con el máximo levantamiento de la Cordillera de Talamanca. Sin embargo, esta diversificación no puede ser explicada por un evento de vicarianza debido a que los linajes correspondientes al Caribe de Costa Rica y Nicaragua (linaje 1) y el linaje del Pacífico de Costa Rica (linaje 3) no constituyen grupos hermanos. Lo cual sugiere que ambos lados de la Cordillera (Caribe y Pacífico) fueron colonizados por *B. asper* de manera independiente, y quizás la Cordillera ya existía en el momento de la colonización.

Varios estudios filogeográficos de taxa que presentan un patrón de distribución similar a las poblaciones de *B. asper* (Aves: *Amazona ochrocephala*: Eberhard y Bermingham, 2004; *Lepidothrix coronata*; Cheviron et al., 2005; ranas: *Pristimantis ridens*: Wang et al., 2008; *Physalaemus pustulosus*: Weigt et al., 2005; *Craugastor crassidigitus*: Crawford et al., 2007; murciélagos: *Carollia*: Hoffmann y Baker, 2003) han incluido en sus análisis moleculares poblaciones procedentes

del occidente, centro y oriente de Panamá. Las filogenias moleculares obtenidas en los estudios realizados por Cheviron et al. (2005), Wang et al. (2008) y Weigt et al. (2005), mostraron que las poblaciones de la zona oriental de Panamá conforman un grupo monofilético distinto de las poblaciones del centro y occidente. En un estudio filogeográfico realizado en *Craugastor crassidigitus* (Crawford et al., 2007) las poblaciones de la zona Central de Panamá (provincias de Veraguas y Panamá) y de la región del Golfo Dulce (Pacífico de Costa Rica) fueron recíprocamente monofiléticas, y ambas formaron el linaje hermano de las poblaciones de la Región Caribe de Costa Rica. De igual forma en *C. talamancae*, las poblaciones de la zona Occidental de Panamá (Bocas del Toro) conformaron un clado con las poblaciones de la región Caribe de Costa Rica (Limón). Este mismo patrón fue observado en el murciélago de cola corta (*Carollia sowelli*) con las poblaciones de Limón (Caribe de Costa Rica) y Chiriquí (Occidente de Panamá) (Hoffman y Baker, 2003). Mientras que las poblaciones de la región oriental de Panamá (localidades de las Perlas y Darién), fueron filogenéticamente mas cercanas (grupo hermano) con las poblaciones de Colombia y Venezuela (Weigt et al., 2005). En nuestra filogenia, a diferencia de los resultados obtenidos por Weigt et al. (2005) solo fue incluida la localidad del Darién (Panamá), y esta hace parte del mismo clado que los especímenes de la

Vertiente Pacífica en Colombia (linaje 4). Esta zona constituye un corredor biogeográfico que forma parte de la Eco-Región Chocó-Darién. Esta Eco-Región se extiende desde el oriente de Panamá en la provincia del Darién y comarca de Kuna-Yala hasta el Cabo Pasado en la provincia de Manabí en el norte de Ecuador (WWF, Fondo Mundial para la naturaleza, Dinerstein et al., 1995).

El análisis molecular de las poblaciones de Colombia, reveló tres linajes (linajes 4, 5 y 6) con alto nivel de estructuración filogeográfica, que presentó concordancia con la estructura fisiográfica de la Cordillera de los Andes. La Cordillera de los Andes alcanza su máxima complejidad geomorfológica en Colombia, donde se divide en tres rangos principales, el Occidental, el Central y el Oriental (Kattan et al., 2004). Varios estudios sugieren que este sistema montañoso es uno de los focos principales de diversificación de plantas vasculares, aves y anfibios (Gentry, 1982; Fjeldsá, 1994; Duellman, 1999), y según Gregory-Wodzicki (2000), constituye el primer evento vicariante que causó la divergencia entre la biota que habita en los bosques húmedos de la región *Trans-Andina* (occidente de los Andes) y la región *Cis-Andina* (Oriente de los Andes). Nuestros resultados no soportaron la relación de grupo hermano entre los linaje de la región Pacífica de Colombia y Panamá, con los linajes de la región Caribe y el Valle del Magdalena, lo cual no permite sugerir un evento vicariante asociado

a las Cordilleras Occidental y Central. El linaje 5 (región Caribe) está enmarcado por las estribaciones de las tres Cordilleras de los Andes, y éstas quizás limitan la dispersión de las poblaciones desde esta región hacia la Vertiente Pacífica (linaje 4). Los linajes 5 y 6 son grupos hermanos con un bajo nivel de divergencia entre ellos (1.8%) y un tiempo de divergencia en el límite del Plioceno-Pleistoceno ó durante el Pleistoceno. Entre estos dos linajes no hay una barrera geográfica evidente, lo cual sugiere que el linaje del Valle del Magdalena podría ser el resultado de un evento de dispersión reciente. Según nuestro árbol filogenético, este linaje presenta el nivel mas bajo de diferenciación genética (mayor número de politomías dentro del grupo), y el largo de ramas mas corto. Además, presenta el menor índice de diversidad haplotípica. La fecha de divergencia estimada entre el linaje de la Vertiente Pacífica (linaje 4) y los linajes 5 y 6, sugiere que estos grupos divergieron posiblemente durante el Plioceno. Estos resultados son concordantes con el período de máximo levantamiento de la Cordillera de los Andes estimado por Gregory-Wodzicki (2000). Según este autor, la altura de la Cordillera de los Andes del Norte se incrementó rápidamente durante el Plioceno, entre 2 y 5 m.a. a tasas de un orden de 0.5-3.0 mm/año, y alcanzó las elevaciones modernas alrededor de 2.7 m.a. Este periodo temporal de diversificación en el nor-occidente de América del Sur, es

coincidente con los datos inferidos por Eberhard y Bermingham (2004) para el complejo de loros *Amazona Ochrocephala* y por Cheviron et al. (2005) para las aves de bosques de tierras bajas, *Lepidothrix coronata*.

Por otro lado, nuestros resultados no soportan la hipótesis propuesta por Nores (2004), sobre el efecto de los ciclos de transgresiones marinas (incremento del nivel del mar ≈ 100 m), en la diversificación de las aves, otros animales y plantas, que habitan las tierras bajas de los bosques húmedos del norte de América del sur. Estas transgresiones marinas ocurridas desde los océanos Pacífico y Caribe durante las fases cálidas del Plioceno (Haq et al., 1987) y Pleistoceno, posiblemente fragmentaron los bosques de tierras bajas del Pacífico en varias áreas, actualmente conocidas como los centros de endemismo del Darién, Chocó, Nechí, Catatumbo y Tumbesian. Los resultados obtenidos en este estudio son congruentes con respecto al aislamiento de las poblaciones de *B. asper* que conforman los tres grandes clados obtenidos en el análisis filogenético. Sin embargo, en nuestros resultados las poblaciones del Darién y del Chocó (linaje 4) no presentaron diferenciación genética y las poblaciones de *B. asper* que corresponderían según Nores (2004) al centro de endemismo Nechí, en este estudio están separadas en dos clados recíprocamente monofiléticos (linajes 5 y 6). Estas incongruencias podrían ser el resultado de eventos a nivel de

mesoescala que no pueden ser explicados con los datos obtenidos en este estudio.

Origen y eventos cladogénicos en B. asper

En este estudio no se consideró a *B. asper* como grupo monofilético, lo cual limitó la inferencia biogeográfica sobre el origen de sus poblaciones. En estudios previos, Parkinson et al. (2002a), plantearon la hipótesis que *B. asper* presenta un origen suramericano a partir de un ancestro que se dispersó desde América Central hacia América del Sur antes del cierre del portal de Panamá. El ancestro de *Bothrops*, presentó una radiación adaptativa rápida y se diversificó en las especies que actualmente conocemos (Wüster et al., 2002a). *B. caribbaeus* y *B. lanceolatus* habitan en las Antillas menores y son consideradas como el grupo hermano de las poblaciones de *B. asper* y el grupo *atrox* (Wüster et al., 2002b). Estos autores utilizando secuencias parciales de los genes mitocondriales *Citocromo b* y *ND4*, encontraron un nivel de divergencia genética entre las *Bothrops* de las Antillas y sus parientes terrestres de 5.9%, el cual es consistente con una división de un linaje que data de finales del Mioceno a inicios del Plioceno (4.2 a 8.9 m.a.). La fecha de divergencia estimada por nosotros y la distancia genética mitocondrial (promedio para todos los clados de *B. asper*:

5.2%), sugieren que estos linajes divergieron en un período mas reciente, posiblemente durante el Plioceno (2.7 a 5.0 m.a.). Este tiempo de divergencia es consistente con el tiempo de divergencia inferido entre los linajes 1 y 2 (región Caribe de Mesoamérica) y los linajes 3, 4, 5, y 6 correspondientes a las poblaciones de la región Pacífica de Costa Rica, Ecoregión Chocó-Darién, Costa Caribe y Valle del Magdalena en Colombia, respectivamente. Nuestros resultados permiten sugerir la hipótesis que durante la radiación adaptativa rápida del ancestro de *Bothrops*, éste divergió en la misma escala temporal para dar origen a las *Bothrops* de las Antillas (2.7 a 5.0 m.a), a las especies que conforman el grupo *atrox* (2.1 a 4.1 m.a.) y al ancestro de *B. asper*. Este ancestro posiblemente colonizó la parte baja de América Central Istmica (Panamá y Costa Rica). Nuestro árbol filogenético, muestra que posiblemente hubo una dispersión norte - sur, desde el Pacífico de Costa Rica hacia el nor-occidente de Colombia durante el Plio-Pleistoceno. Esto concuerda con el tiempo de divergencia obtenido para los linajes 5 y 6 (Pleistoceno: 0.6 a 1.7 m.a.), los cuales son los linajes mas derivados con un nivel de divergencia genética mitocondrial entre clados menor (1.8% a 4.8%) que la hallada en las poblaciones de Mesoamérica (4% a 6.6%). Con respecto a las poblaciones de Mesoamérica Caribe (linajes 1 y 2), nuestros resultados no permiten sugerir una ruta de

dispersión, debido a que su posición filogenética no está bien soportada y hay carencia de un muestreo representativo de Panamá como una posible zona de contacto. Sin embargo, el tiempo de divergencia de estos linajes corresponden a la misma ventana temporal (Plioceno) que los linajes del Pacífico de Costa Rica y el Pacífico de Colombia y Panamá, lo cual podría deberse a una dispersión bidireccional a cada lado de la Cordillera de Talamanca.

Implicaciones taxonómicas

La filogenia obtenida con DNA mitocondrial mostró que los grupos de *B. asper* analizados presentan estructuración filogenética con una historia evolutiva antigua (concepto filogenético de especie; Cracraft, 1983). La distancia genética entre los linajes 1 y 2 (Mesoamérica región Caribe) y los linajes 3 (región Pacífica de Costa Rica), 4 (Ecoregión Chocó- Darién), 5 (región Caribe en Colombia) y 6 (Valle del Magdalena) de *B. asper* (5.3% a 7.9%) es equivalente o mayor que la distancia genética en la misma región mitocondrial entre varias especies de serpientes como *Lachesis stenophrys* y *L. melanocephala* (5.3%; Zamudio y Greene, 1997), el complejo *Naja nigricollis* (4.7% a 8.3%; Wüster et al., 2007), y algunas especies del género *Agkistrodon* (4.0% a 6.4%; Parkinson et al., 2000). Trabajos previos han demostrado que las poblaciones de *B. asper* que habitan a cada lado

de la Cordillera de Talamanca presentan diferencias en la época reproductiva (Solórzano y Cerdas, 1989; Sensus Campell y Lamar, 2004), variabilidad geográfica en los efectos farmacológicos del veneno (Gutiérrez et al., 1980) y en su composición (Alape-Girón et al., 2008). Con respecto a la reproducción, la época de apareamiento para las poblaciones del Caribe ocurre en marzo y el parto ocurre entre septiembre y noviembre. En contraste con las poblaciones del Pacífico, en las cuales el apareamiento ocurre de septiembre a noviembre y el parto ocurre de abril a junio (Solórzano y Cerdas, 1989; Sensus Campell y Lamar, 2004) . De igual forma, los venenos de las poblaciones de la costa Caribe de Costa Rica son mas hemorrágicos y mionecróticos, mientras que los de la región Pacífica son mas proteolíticos pero presentan similitud en cuanto a la actividad letal, edematizante y efecto hemolítico (Gutiérrez et al., 1980). Más recientemente, Alape-Girón et al. (2008), analizaron la composición del veneno de especímenes adultos y recién nacidos de éstas poblaciones y encontraron diferencias en algunas isoenzimas de las fosfolipasas A₂, Serina Proteinasas y familias de Metaloproteinasas (SVMP, por su sigla en inglés). Las diferencias en el comportamiento reproductivo, la variabilidad geográfica del veneno y los resultados moleculares obtenidos en el presente estudio permiten plantear la hipótesis de una posible especiación alopátrica entre los linajes de Mesoamérica

Caribe y los del Pacífico de Costa Rica. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis basada en dos marcadores mitocondriales (De Queiroz, 1998; Moritz et al., 1992; Wake y Schneider, 1998) resulta imprescindible incorporar genes nucleares, aumentar el número de localidades ubicadas en ambas vertientes e incorporar en el análisis poblaciones de Panamá, principalmente de la zona occidental y central. En esta región, las poblaciones de *B. asper* de ambas vertientes quizás convergen en una zona de contacto, en forma similar a lo descrito por Weigt et al. (2005) con aloenzimas de poblaciones de rana Túngara (*Physalaemus pustulosus*) del occidente de Panamá.

Agradecimientos:

Nosotros agradecemos a el personal de los diferentes museos citados en el texto. Janeth Lucía García, Vitelbina Núñez y Jorge Enrique Asprilla en el Programa de Ofidismo / Escorpionismo de la Universidad de Antioquia. Vivian Páez y Juan Pablo Hurtado en el Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia. Francisco Rúiz en el Instituto Nacional de Salud. Fabián Bonilla en el Instituto Clodomiro Picado. Sergio Medrano y John Alexander Calderón del Zoocriadero Zoojuncal. A CONICYT (Proyecto Beca AT-24060101) por el apoyo económico para el desarrollo de la tesis doctoral, que permitió la realización de viajes a Colombia y a Costa Rica. Para la obtención de las muestras de tejido de Colombia, se contó con el permiso de Acceso a Recursos genéticos. Este permiso fue otorgado por La Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales, Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia (Resolución No. 1392 del 01 de agosto del 2008).

Apéndice A

Lista de Especímenes utilizados en el estudio

Especie	Localidad	País	Voucher	Cyib	ND4
<i>Bothrocophias microphtalmus</i>	Pasco	Perú	LSMUZH-9372	AF292577	AF292615
<i>Bothrocaphalus hyoproru</i>		Ecuador		AF292576	AF292614
<i>Bothrops alternans</i>	Paraná, Pinhão	Brazil	IB-54314	AF292579	AF292617
<i>Bothrops ammodontoides</i>	Neuguen	Argentina	MVZ-223514	AY223595	AY223639
<i>Bothrops insularis</i>	São Paulo, Ilha da Queimada Grande	Brazil		AF292590	AF292628
<i>Bothrops diporus</i>	La Rloja	Argentina	PT3404	DQ305472	DQ305489
<i>Bothrops erythromelas</i>	Gunambi, Bahia	Brazil	IB-55541	AF292588	AF292626
<i>Bothropsis hillnema</i>	Macuma, Morona Santiago	Ecuador	FHGO 982	AF292592	AF292630
<i>Bothropsis taeniata</i>	Macuma, Morona Santiago	Ecuador	FHGO 195	AF292591	AF292629
<i>Bothrops venezuelensis</i>		Venezuela		pendiente	pendiente
<i>Bothrops colombiensis</i>	Valencia	Venezuela		pendiente	pendiente
<i>Bothrops caribbaeus</i>	Grande Anse	Saint Lucia		AF292598	AF292636
<i>Bothrops lanceolatus</i>		Martinique		AF292599	AF292637
<i>Bothrops atrox</i>			WWW-743	AY223598	AY223641
<i>Bothrops isabellae</i>	Guanare, Portuguesa	Venezuela		AF292603	AF292641
<i>Bothrops isabellae</i>	Pajarito, Boyaca	Colombia	INS B32	pendiente	pendiente
<i>Bothrops isabellae</i>	Arauca	Colombia	INS B22	pendiente	pendiente
<i>Bothrops leucurus</i>	Porto Seguro, Bahia	Brazil	IB 55480	AF246273	AF246284
<i>Bothrops sp.</i>		Ecuador		pendiente	pendiente
<i>Bothrops atrox</i>	Pucallpa	Peru		pendiente	pendiente
<i>Bothrops moojeni</i>	Brasilia	Brazil	IB 56558	AF292606	AF292644
<i>Bothrops marajoensis</i>	Para, Ilha de Marajó	Brazil		AF292605	AF292645
<i>Bothrops atrox</i>	Mela	Colombia	SUA 2198	pendiente	pendiente
<i>Bothrops atrox</i>	Fomeque, Cundinamarca	Colombia	INS B01	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Metagalpa	Nicaragua	ENS 9834	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Sarapiquí, Heredia	Costa Rica 1	DPL 2900	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Monte Verde, Limon	Costa Rica 2		pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Carlos, Alajuela	Costa Rica 3	ICP 405	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Carlos, Alajuela	Costa Rica 4	ICP A0 04-04	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Carlos, Alajuela	Costa Rica 5	ICP A01 03-01	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Quebrada Ganado, San José	Costa Rica 6	MZUCR-11152	AY221599	U41876
<i>Bothrops asper</i>	Acosta, San José	Costa Rica 7	ICP 461	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Acosta, San José	Costa Rica 8	ICP Pac 02-02	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Quebrada El Branchi, Ca. 2 km E of la Libertad, Izabal	Guatemala 1	ENS 6062	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Gringo Perdido, NE side of Lago Peten Itza, Peten	Guatemala 2	JAC 21101	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Peten	Guatemala 3	ICP 1156	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Copan	Honduras	ICP 1282	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Mile 38, Western Highway, Belize Zoo	Belize		AF292600	AF292638
<i>Bothrops asper</i>	Sierra de los Tuxtlas, Volcan San Martin, Veracruz	Mexico 1	ENS 10377	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Municipio Zongolteca, Atlixac, Veracruz	Mexico 2	JAC 22895	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Martin, Rancho Primero De Mayo, Veracruz	Mexico 3	JRM 4044	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Carretera Tuxtpeco, Valle Nacional, km 30.5, Oaxaca	Mexico 4	ENS 9995	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>		Ecuador	INHMT 4033	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Bahia Solano 1, Choco	Colombia	SUA 1576	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Bahia Solano 2, Choco	Colombia	SUA 1223	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Buenaventura, Valle del Cauca	Colombia	INS B60	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Carepa, Antioquia	Colombia	SUA 3241	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	La Changa, Darien	Panama	ICP 1286	pendiente	pendiente

Apéndice A

Lista de Especímenes utilizados en el estudio. Continuación.

Especie	Localidad	País	Voucher	Cyib	ND4
<i>Bothrops asper</i>	Lloró 1, Chocó	Colombia	SUA 3818	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Lloró 2, Chocó	Colombia	SUA 3487	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Mulata, Antioquia	Colombia	MHUA 14438	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Nuquí 1, Chocó	Colombia	MHUA 14437	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Nuquí 2, Chocó	Colombia	SUA 1280	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Unguía, Chocó	Colombia	SUA 2256	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Cáceres, Antioquia	Colombia	SUA 2698	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Caucasia 1, Antioquia	Colombia	SUA 2375	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Caucasia 2, Antioquia	Colombia	MHUA 14447	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Caucasia 3, Antioquia	Colombia	SUA 3971	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Fundación, Magdalena	Colombia	SUA 2937	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Necolí, Antioquia	Colombia	SUA 3395	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Ocaña, Norte de Santander	Colombia	SUA 2909	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Planeta Rica, Córdoba	Colombia	SUA 2696	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Valdivia, Antioquia	Colombia	MHUA 14327	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Tierralta, Córdoba	Colombia	SUA 3850	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Turbaco 1, Bolívar	Colombia	SUA 3849	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Turbaco 2, Bolívar	Colombia	SUA 1691	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Cimitarra 1, Santander	Colombia	SUA 2388	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Cimitarra 2, Santander	Colombia	SUA 2446	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Cimitarra 3, Santander	Colombia	SUA 2464	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Cimitarra 4, Santander	Colombia	MHUA 14400	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Gómez Plata, Antioquia	Colombia	SUA 2990	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Ibagué, Tolima	Colombia	MHUA 14444	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	La Victoria, Caldas	Colombia	SUA 3124	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Maceo 1, Antioquia	Colombia	SUA 3123	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Maceo 2, Antioquia	Colombia	MHUA 14310	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Maceo 3, Antioquia	Colombia	MHUA 14311	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Maceo 4, Antioquia	Colombia	SUA 2972	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Maceo 5, Antioquia	Colombia	SUA 3961	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Mariquita, Tolima	Colombia	SUA 3367	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Porce, Antioquia	Colombia	SUA 2119	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 1, Antioquia	Colombia	SUA 2311	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 2, Antioquia	Colombia	SUA 3375	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 3, Antioquia	Colombia	SUA 2243	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 4, Antioquia	Colombia	SUA 1284	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 5, Antioquia	Colombia	SUA 2721	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 6, Antioquia	Colombia	SUA 2720	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 7, Antioquia	Colombia	SUA 2683	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Puerto Berrio 8, Antioquia	Colombia	SUA 2683	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Zoocriadero El Faisán, Río Claro, Antioquia	Colombia	SUA 2978	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Carlos 1, Antioquia	Colombia	SUA 2344	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Carlos 2, Antioquia	Colombia	SUA 2043	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Carlos 3, Antioquia	Colombia	SUA 3174	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Luis 1, Antioquia	Colombia	SUA 2783	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Luis 2, Antioquia	Colombia	SUA 3783	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Miguel, Antioquia	Colombia	SUA 3333	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	San Rafael, Antioquia	Colombia	SUA 2782	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Sonsón, Antioquia	Colombia	SUA 3346	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Vegachi 1, Antioquia	Colombia	SUA 2784	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Vegachi 2, Antioquia	Colombia	SUA 2732	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Vegachi 3, Antioquia	Colombia	SUA 3050	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Yolombó, Antioquia	Colombia	SUA 2707	pendiente	pendiente
<i>Bothrops asper</i>	Yondo, Antioquia	Colombia	SUA 2707	pendiente	pendiente

CAPITULO III

PHENOTYPIC DIFFERENCES IN A CRYPTIC PREDATOR: FACTORS INFLUENCING MORPHOLOGICAL VARIATION IN THE TERCIOPELO *BOTHROPS ASPER* (GARMAN, 1884; SERPENTES: VIPERIDAE)

Mónica María Saldarriaga-Córdoba^{1,2*}, Mahmood Sasa³, Marco Antonio Méndez¹

¹ Laboratorio de Genómica Evolutiva, INTA, Universidad de Chile. Macul. 5540. Macul. Santiago. E-mail: monysalda@yahoo.com.ar

² Programa de Ofidismo/Escorpionismo, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Running title: Phenotypic variation B. asper

* Corresponding author. Tel.: þ506 2229 3135; fax: þ506 2292 0485.
E-mail addresses: monysalda@yahoo.com.ar (M.M. Saldarriaga-Córdoba),
msasamarin@gmail.com (M. Sasa).

Abstract

The terciopelo *Bothrops asper*, is a cryptic lancehead pitviper widely distributed in humid environments of Middle America and the northwestern portion of South America. Throughout its extensive distribution, the terciopelo exhibits great morphological variation in external characters, a situation that has complicated its proper separation from other related species. In this paper, we analyzed the phenotypic variation of *B. asper* based in a sample of 514 specimens from nine distinct physiographic regions. Univariate and multivariate analyses demonstrated great phenotypic differentiation among most pre-established groups, and the pattern is fairly congruent between sexes. However, no correspondence was observed between morphological variation and molecular divergence, inferred from mtDNA sequences, between individuals representing the physiographical regions under study. Geographic variation in the number of interrials, ventral scales, subcaudal scales and dorsal blotches were positively correlated with latitude, number of dry months, but inversely related with precipitation. However, other variables do not exhibit such an effect. The observed relationships between scale counts and environmental variables are explained in terms of selective pressures to improve water balance along the distributional range of the species. *Key words:* Neotropical region, scutellation, geographic variation, pit viper, Mantel test, ecogenetics.

Introduction

Measures of intraspecific variation in morphological and molecular features are fundamental in the study of evolutionary changes among populations. In squamates, most accounts of phenotypic variation are based on scutellation characteristics (Thorpe, 1991; King, 1997; Puerto et al., 2001; Santos and Pleguezuelos, 2003; Mulcahy and Archibald, 2003; Calsbeek et al., 2006; Mulcahy, 2008), color patterns and pigmentation (Giraudó et al., 2006; Allsteadt et al., 2006), scale shape and ornamentals (Brown et al., 1997; Gaulke et al., 2007), and the use of morphometrics (Auffenberg, 1955).

Often, external characters show high levels of polymorphism (Bittner and King, 2003; Kark, 2003), resulting in increased overlap among groups, even among those not so closely related. This situation frequently occurs when convergence in morphological characters results from adaptations to extrinsic ecological factors (Sanders et al., 2004).

The effects of ecogenetic and phylogenetic attributes in shaping patterns of morphological variations have been addressed mostly in island populations of lizards (Brown et al., 1991; Thorpe, 1991; Malhotra and Thorpe, 1997), and snakes (Castellano et al., 1994), where selective forces act rapidly to maintain phenotypic plasticity. For instances, in pit vipers of the *Trimeresurus sumatranus*

complex, selection to control water loss determines head scale frequency. Therefore, differences in number of scales among populations are determined by environmental temperature and precipitation and not by their phylogenetic relationships (Sanders et al., 2004).

Analyses of phenotypic differentiation often involve multivariate statistics (Wüster et al., 1997; Puerto et al., 2001) that evaluate variables as they are incorporated into a model, and improve our ability to distinguish among groups with extensive overlap (Thorpe, 1976; Thorpe and McCarthy, 1978; Taylor and Cooley, 1995). These techniques are usually coupled with correlation procedures (i.e. Mantel and Partial-Mantel Test, Thorpe, 1991), allowing to assess potential causal factors for such differentiation (i.e. geography, geology, environment, and ontogeny) while controlling for confounding inter-correlates. In this way, hypothetical causes affecting traits used in taxonomy can be evaluated, a useful measurement in the study of taxonomically challenging species.

The present work describes the morphological variation in one such problematic species: the Central America lancehead, *Bothrops asper*. This pitviper is the only member of its genus widely distributed in humid lowlands of Middle America as well as in north-western South America (Campbell and Lamar, 2004; Sasa et al., 2009). In this region, *B. asper* is found mainly west of the Andes in

Colombia and Ecuador, although it also reaches Venezuela, Trinidad, and the north eastern extreme of Perú (Venegas et al., 2008). In Colombia, this species also inhabits the inter-Andean valleys (Moreno-Arias et al., 2008) and in the Departamento del Cesar, in the Caribbean (Ramírez-Ávila et al., 2003), whereas in Ecuador, the range of the species west of the Andes extends to the Loja province (Freire and Kuch, 1994; Cisneros-Heredia and Touzet, 2004; Boada and Salazar, 2005).

Bothrops asper is included in the *B. atrox* group that comprises the following related species: *B. atrox*, *B. isabellae*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, and *B. moojeni* (Salomão et al., 1997). Members of this clade are superficially similar in appearance, especially in their cryptic color patterns, and show high overlap in meristic characters. Consequently, major taxonomic confusion has followed the assignment of populations into nominal species (see Campbell and Lamar, 2004).

Furthermore, extensive variance in toxin composition has been reported for *Bothrops asper* (Jiménez-Pórras, 1964; Lomonte and Carmona, 1992; Alape et al., 2008) further complicating the identification of the species. In Costa Rica, differences in biological effects induced by venoms from distinct geographic regions (Gutiérrez et al., 1980) are so clear that some authors (e.g. Aragón and

Gubensek, 1981) have suggested that taxonomic recognition of the populations of *B. asper* isolated in the Central America Isthmus can be supported. It is not clear if other populations within the entire range of the species exhibit such remarkable differences in venom composition.

Using a large set of characters, Sasa (2002) presented a detailed account on the extent of morphological variation in *B. asper* from Middle America. His findings support the notion that meristic characters are extremely plastic at the intraspecific level, and that geographic, gender, and age effects should be considered in taxonomic evaluations for the species. Briefly, age does not affect scutellation, although it influences color patterns. Sexual dimorphism is evident in body size (females larger than males) and some meristic variables. Sasa (2002) also noticed the existence of two, clear morphological groups in Middle America: one that includes populations located in the northern portion of the species' range (Mexico-Honduras) and the other including populations from southern Nicaragua to Panama. Within each group, scutellation is fairly homogeneous, but there are substantial differences in scale counts when the groups are compared to each other.

On the other hand, little is known about the genetic structure of populations of this species. Using metabolic allozymes as molecular markers, Sasa and

Barrantes (1998) suggested that –at least in Costa Rica– a great level of gene flow occurs between populations, even between those that are isolated through topographical barriers. These findings lead these authors to conclude that either the process of population isolation is relatively recent, or that an important level of gene flow still occurs between populations thought to be relatively isolated in the country.

The large amount of intraspecific variability observed in sampled populations of *B. asper* deserves a more comprehensive analysis, one that includes samples from the entire range of its distribution. Furthermore, in order to understand the origin of such diversity, it is necessary to analyze the association of morphological groups with their molecular identity, and the correspondence with environmental factors that might shape them. In this study, we analyze the morphological variation in *B. asper* along most of its geographical range, and we evaluate the role of molecular and environmental factors to explain the observed pattern of geographic variation. In particular, our goal is to establish whether geographic variation is a consequence of current ecological conditions and selective pressures or results from phylogenetic variation within this nominal species.

Materials and Methods

Specimens and morphological variables

We construct a database for 514 individuals *Bothrops asper* (218 males and 296 females), obtained from localities along the species' distribution and preserved in several museums (see **Appendix 3.1**). In addition, we also analysed live individuals from the collections of the Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica) and the Programa de Ofidismo/Escorpionismo (Universidad de Antioquia, Colombia). Nine relevant meristic characters of scutellation, and color pattern commonly used in taxonomic work in *Bothrops* (Burger, 1971) were selected, mainly because they showed a significant gender or geographic effect in previous analyses (Sasa, 2002). Variables included are: (1) dorsal scale rows; (2) ventral scales (Dowling, 1951); (3) subcaudal scales; (4) superlabial plates; (5) infralabial plates; (6) interriotal scales (scales in the dorsum of the head along a line through the angle of the jaw); (7) dorsal blotch number; (8) width of the post-ocular band (number of scales in the band at its widest point); and (9) snout-vent length. The number of ventral scales was counted by the method of Dowling (1951), not considering the pre-ventral scales or the anal scale. The subcaudal scales were counted by pairs of segments, from the pair immediately anterior to the terminal spine to the last pre-cloacal pair (Gans, 1964). Snout-vent

length was measured from the tip of the snout to the posterior border of the anal plate with a flexible metric tape to the nearest 1 mm.

Since *B. asper* shows sexual dimorphism in many selected variables (Sasa, 2002), the meristic data was analysed separately for males and females. The sex of preserved specimens was determined by observing the presence or absence of a hemipenis through an incision in the posterior part of the cloaca.

To assess the variation of geographically distinct populations, specimens from adjacent localities were pooled into nine distinct physiographic regions (Fig. 3.1). Those regions are as follows: (1) México-Nuclear Central America (MNCA), including specimens from the Caribbean coast of México, Belize, Guatemala, and Honduras. This region also includes specimens from Escuintla in south Pacific Guatemala; (2) Caribbean Isthmian Central America (CICA), which includes individuals from the Caribbean region of Costa Rica and southeastern Nicaragua; (3) Pacific Costa Rica (PCR), including only specimens from the central and south Pacific of Costa Rica. (4) Chiriquí (CH), including locations from the western Pacific Panamá; (5) Caribbean and Central Panama (CCP), locations from the Caribbean and central lowlands of the country, including the Canal Zone; and (6) Darien Region (DRN), grouping samples from the Darien region in eastern Panama that includes the type locality of *B. asper* (Garman

1984); (7) Pacific Colombia (PC), localities west of the Cordillera Occidental; (8) Magdalena Valley (MV), localities between Cordillera Central and Cordillera Oriental in Colombia; and (9) Caribbean Colombia (CC), localities in the lowlands and valleys of the Rio Cauca and Rio Magdalena.

MNCA and CICA correspond to physiographic regions separated by the Nicaraguan depression until Pliocene. PCR and CICA were separated since the late Tertiary by the development of the central mountain axis that divides the Isthmian Central America lowlands (Savage, 2002).

Several specimens from Panama lack exact information about their origin, and we decided to follow a conservative approach in this analysis. Thus, individuals from CH were separated from those obtained at PCR, and those from CCP were separated from CICA. In either case, no obvious historical or biogeographical close affinities to the Chocoan region (Behling et al., 1998; Morrone, 2001; Savage, 2002), samples from DRN were analyzed separately here. South American specimens were included in three separated regions (PC, MV, and CC) delimited by the mountain ranges that collectively form the Northern Andes in Colombia (Kattan et al., 2004).

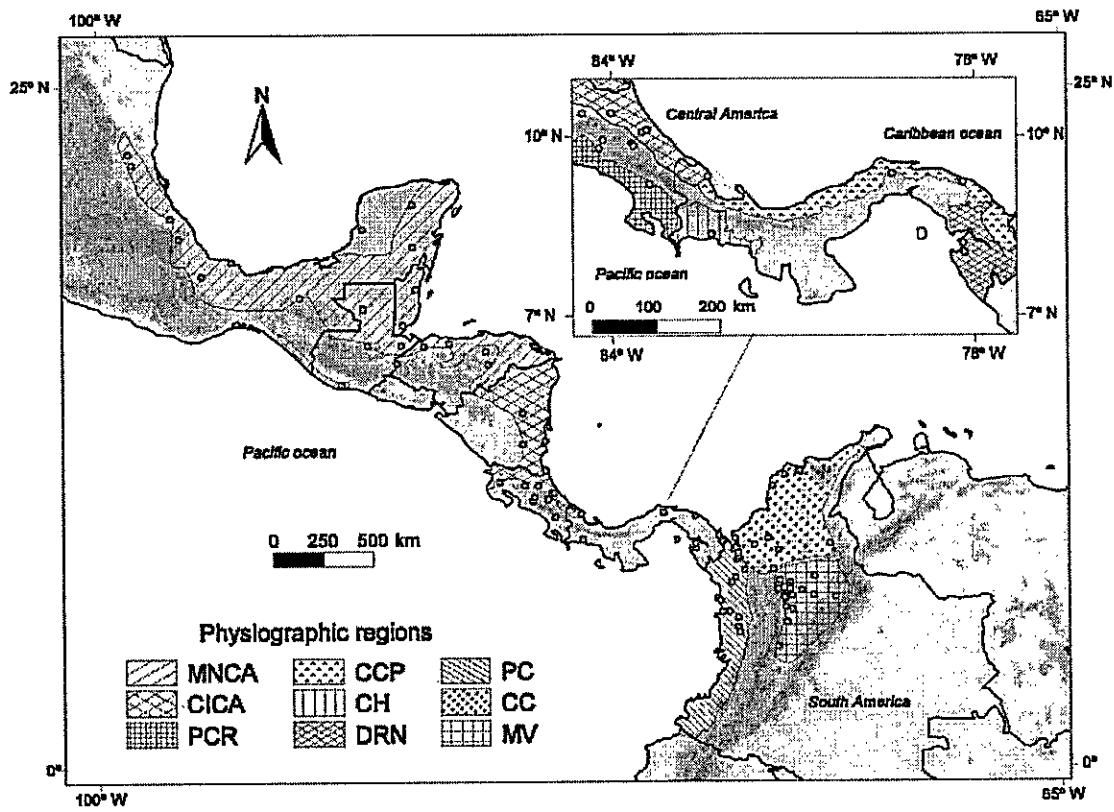


Fig. 3.1. Map of Middle America and northern South America showing sampling sites for *B. asper* samples used in this study. Dots represent the localities from where specimens were collected. Inset map shows CH, CCP and DRN physiographic regions in Panama. Elevations above 1000 m are shown in gray shades.

Molecular data

To assess molecular differences within each physiological region, tissue samples from 12 live specimens and two sequences published in GenBank were obtained from each one of them, excluding Chiriqui and Central Panama

(Appendix 3.2). Total DNA was extracted following the procedure described by Jowett (1986). Fragments from two mitochondrial genes, Cytochrome b (Cyt b) and ND4, were amplified according to the procedures outlined in Arévalo et al. (1994) and Parkinson et al. (2002a). PCR reactions were set up in a final volume of 25 μ l (2.0 μ l genomic DNA, 0.4 μ l of each primer (10 μ M), 2.5 μ l of 10X PCR buffer, 0.25 μ l total dNTPs (10mM), 1.0 μ l of MgCl₂ (50 mM), 0.2 μ l of Taq polymerase (5U/ μ l), and 18.25 μ l H₂O). Typical amplification conditions involved initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 38 cycles of 94°C for 40 s, 54°C of annealing for 40 s, then 72°C for 1 min, followed by a final extension step of 72 °C for 5 min. The amplified product was sequencing using the same primers by Macrogen (Seoul, S. Korea- <http://dna.macrogen.com>).

DNA sequences were aligned by eye with GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997). We inferred the amino acid sequences for all DNA sequences to check for the presence of premature stop codons or other nonsense mutation. Pairwise comparisons of observed proportional sequence divergence (p distance) were obtained using the computer program Mega version 3.0 (Kumar et al., 2004).

Phylogenetic analysis of DNA sequences analysis was performed using Bayesian method with the computer program MrBayes 3.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). We used as outgroup *B. caribbaeus* and *B. lanceolatus*

according to Wüster et al. (2002a). In this work the two species form a monophyletic group, which in turn form the sister clade to the *Bothrops asper-atrox* complex.

To identify the most appropriate model of sequence evolution for the complete data set (Nd4 and Cyt b concatenated), we used MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004), and selected the model favored under the Akaike Information Criterion in our Bayesian analysis. Four chains were run for 5×10^6 generations and sampled every 1,000 generations. Nodal support was assessed by examining posterior probabilities in the Bayesian analyses. Posterior probabilities indicate percentage of the time that a given clade occurs among trees sampled in the Bayesian analyses (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

Environmental data

In our analysis, we accounted for environmental factors that we suspect to affect morphological variables. Latitude and longitude were taken as a proxy to geographic distance. Mean annual precipitation records, temperature and number of dry months per year from each sampled locality were retrieved from the climate databases of each country (Appendix 3.3). The climatic constraining factors are the number of dry and cold months. According to

Bagnouls and Gaussen (1957) a month is considered "dry" when the average total rainfall (P), in mm, is less than twice the mean temperature (T), in °C ($P \leq 2T$).

Statistical analysis

Because the meristic characters used in this study violate the assumptions of normality (Gnanadesikan, 1977) and heteroscedasticity (Winer et al., 1991), we used non-parametric techniques to assess morphological variation. For each sex separately, morphological variables were standardized (Clarke, 1993), and the Euclidean distances among the nine physiographic regions were estimated from them. Non-metric Multidimensional Scaling (MDS) was conducted to visualize the pattern of segregation among sampled regions. This is a robust ordination method that allows reducing variables without a priori transformations, so individuals can be represented in two-dimensional plots (Lessa, 1990). MDS has been successfully applied in other morphological studies aimed to estimate nonlinear monotonic relationships (Maltagliati et al., 2001; Chui et al., 2002).

We conducted analysis of similarity (ANOSIM, Clarke, 1993) to test the degree and significance of differences among the groups observed in the MDS plot. ANOSIM is analogous to the analysis of variance (ANOVA), but computes

the R-statistic (the difference of mean ranks between and within groups) that measures the degree of similarity between pairs of samples. Thus, R equals 1 if all individuals within a population are more similar to each other than to any individual in another population and 0 if there is no difference between populations. ANOSIM incorporates an approximate randomization test to assess for statistical significance (Clarke and Warwick, 2001).

Univariate data analysis was performed using STATISTICA (version 6, StatSoft, Inc. 2004), whereas multivariate analyses were implemented in PRIMER program 5.0 (Clarke and Warwick, 2001, Plymouth Marine Laboratory UK). The similarity percentages (SIMPER) procedure in PRIMER was used to calculate the percentage contribution of each morphological character to the overall difference among groups.

In order to determine the association of external factors (latitude, longitude, precipitation, temperature and number of dry months) with the observed pattern of morphological variation, we conducted Spearman rank correlations (r_s) against single morphological characters. Likewise, matrix correlations (Mantel test) implemented in the program Zt (Bonnet and Van de Peer, 2002) were performed to test for association between geographical proximity, molecular distance, and environmental similarity with morphological variation.

Partial Mantel tests were used to evaluate the effects of environmental factors in phenotypic differentiation, while controlling for the effects of geographic proximity. Additionally, we evaluated the effects of geographic proximity in phenotypic differentiation, while controlling for environmental factors.

Results

Variation in scutellation

Except for labial scales and the post-ocular band width, other scutellation characters included in this study exhibit great levels of divergence among regions (Table 3.1). Number of supralabials ranged from 7 to 8, whereas the number of infralabials varied from 9 to 12. Through the geographical range of the species, the post-ocular band varied between 0.5 and 2.0 scales wide. None of these variables show sexual dimorphism. Overall, the number of dorsal scale rows at mid-body ranged between 23 and 29, whereas subcaudal scales ranged from 53 to 58 pairs. In general, males average fewer mid-body rows of dorsal scales and have more subcaudal scales than females, a trend that is sustained in all physiographic regions (Table 3.1). The number of interribral scales varied from 22 to 33 in the overall sample; we found this trait to be sexually dimorphic in four regions evaluated (MNCA, PCR, PC and VM).

Región	S	n	Interrictal			Ventral			Mid-Body dorsals			Blotch number			Subcaudal		
			Md	SD	SC	Md	SD	SC	Md	SD	SC	Md	SD	SC	Md	SD	SC
MNCA	F	86	28.0	1.6	U=2402	210.0	4.7	U=3024	27.0	0.9	U=1229	23	2.0	U=2850	63.0	3.6	U=1003
	M	73	27.0	1.6	P=0.008	209.0	4.3	P=0.605	25.0	1.0	P<0.001	23	2.0	P=0.265	69.0	3.5	P<0.001
CICA	F	51	26.0	1.5	U=736	193.0	4.5	U=731	27.0	1.4	U=380	19	2.0	U=785	64.0	2.4	U=174
	M	31	26.0	1.7	P=0.605	192.0	5.7	P=0.569	25.0	0.6	P<0.001	19	1.8	P=0.958	69.0	3.4	P<0.001
PCR	F	33	27.0	1.4	U=275	199.0	3.8	U=345	27.0	1.3	U=231	20	1.8	U=373	64.0	2.4	U=71
	M	26	26.0	1.3	P=0.019	197.0	5.1	P=0.202	25.0	1.4	P=0.003	19	1.8	P=0.393	71.0	3.2	P<0.001
CH	F	14	27.0	1.1	U=15	205.0	4.5	U=25	27.0	1.0	U=16	22	2.4	U=28	64.5	3.5	U=9
	M	5	26.0	1.1	P=0.071	205.0	4.1	P=0.379	25.0	1.1	P=0.078	22	0.9	P=0.517	70.0	3.9	P=0.017
CCP	F	19	26.0	1.8	U=87	195.0	3.2	U=114	27.0	1.2	U=46	17	1.9	U=82	65.0	2.7	U=38
	M	14	25.5	1.5	P=0.144	195.0	3.3	P=0.662	25.0	0.6	P=0.002	18	1.5	P=0.095	68.5	3.3	P<0.001
DRN	F	8	25.0	1.7	U=24	195.5	5.9	U=26	27.0	1.0	U=4	17	1.7	U=30	61.5	1.7	U=2
	M	8	24.5	1.4	P=0.431	195.0	4.9	P=0.529	23.5	1.0	P=0.004	17	1.5	P=0.875	68.0	4.1	P=0.001
PC	F	20	25.0	1.2	U=93	190.5	3.9	U=185	27.0	0.6	U=21.0	18	1.5	U=135	57.0	2.4	U=35
	M	20	24.0	1.0	P=0.004	189.5	4.1	P=0.685	25.0	0.4	P<0.001	18	1.5	P=0.079	64.0	2.7	P<0.001
MV	F	50	27.0	1.4	U=254	201.0	3.4	U=577	27.0	0.8	U=104	20	1.6	U=254.5	60.0	3.3	U=76
	M	27	25.0	1.2	P<0.001	199.0	2.7	P=0.298	25.0	0.4	P<0.001	20	1.1	P<0.001	66.0	3.2	P<0.001
CC	F	15	26.0	1.4	U=71	200.0	6.7	U=74	27.0	0.6	U=20	20	2.0	U=104.5	63.0	4.3	U=33
	M	14	25.0	1.1	P=0.138	197.0	5.3	P=0.183	25.0	1.2	P<0.001	20	1.6	P=0.983	65.0	2.5	P=0.002

Table 3.1. Geographical and sexual variation in *Bothrops asper* morphological characters. Abbreviation: n= sample size; SD= Standard Deviation; S= Sex; F= Female; M= Male; Md, Median; SC= Statistical Comparison (Mann Withney-U); MNCA, Mexico and Nuclear Central America; CICA, Caribbean Isthmian Central America; PCR, Pacific Costa Rica; CH, Chiriquí Province; CCP, Caribbean Central Panama; DRN, Darién; PC, Pacific Colombia; MV, Magdalena Valley; CC, Caribbean Colombia. Significant differences are shown in gray.

In general, ventral scales ranged from 182 to 220, but we did not find differences in the number of these scales between males and females at any region (Table 3.1). Likewise, we did not notice an effect of sex in the number of dorsal blotches at each region, except in Magdalena Valley, where blotches varied from 14 to 27 blotches (Table 3.1).

The overall pattern of morphological differentiation among physiographic regions is roughly congruent for males and females (Fig. 3.2, Table 3.2), although we detected some differences in the separation of regions located within Lower Central America (CICA, PCR, CCP, DRN). Thus, females from CICA differ from those females from PCR and CCP, although the separation is weak as suggested by the low R-values obtained ($R < 0.17$ in both cases). Conversely, separation among males from those regions is not sustained in our analysis, and despite the barrier imposed by the central mountain axis of Costa Rica and western Panama, males from CICA do not differ morphologically from those from PCR (Table 3.2). Similarly, low R-values obtained suggest that males from PCR do not differ from those coming from CCP ($R = 0.01$, $P = 0.063$), although females do ($R = 0.29$, $P = 0.001$). As in these analyses the proportion of males and females at each region is similar ($\chi^2 = 7.96$, $df = 8$, $P = 0.446$), the observed differences in the resolution of Lower Central American regions by

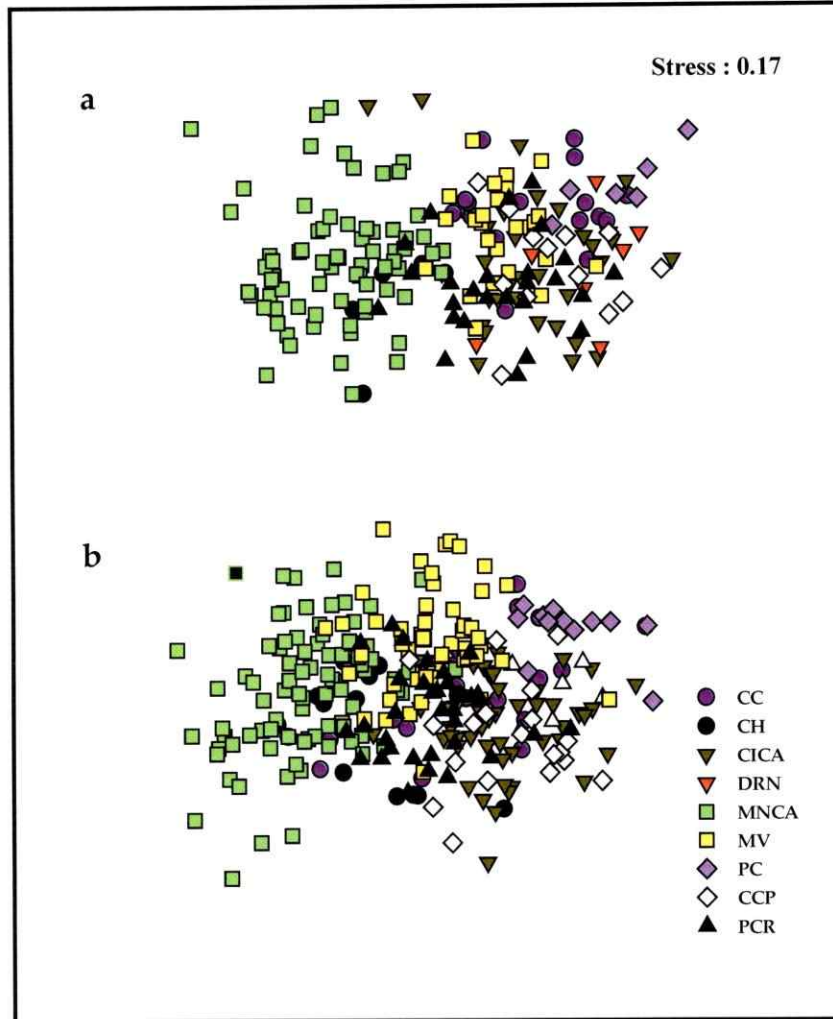


Figure 3.2. Multidimensional scaling plot showing separation of *B. asper* males (a) and females (b) from nine physiographic regions in terms of meristic characters. An analysis of similarity supports significant clustering among several groups; see **Table 3.2** for abbreviations and Anosim results.

sex cannot be attributed to the effect of sample sizes differences.

In both sexes, snakes from Darien (DRN) do not differ morphologically from those from Caribbean and Central Panama (CCP), nor with those from other

localities along the Caribbean of Costa Rica and Nicaragua (CICA). Overall, these results suggest that the populations from CICA and the Caribbean, Central and eastern regions of Panama (CCP and DRN) are very similar in morphology.

In Fig. 3.2, samples from MNCA and those from CH separate from other regions in Lower Central America and South America (Table 3.2). In addition, for both sexes there is a high degree of overlap between samples from MNCA and CH, precluding morphological differentiation between them.

Among our South American samples, females from CC overlap with those from DRN ($P = 0.57$), but this result is not observed in the males ($P = 0.001$). Aside from this case, South American populations are clearly distinct from Middle American populations of both sexes, and are also distinct among themselves (Table 3.2). Thus, snakes grouped in the PC region are strongly differentiated from those from MV, and from those originating in CC ($P < 0.005$ in all cases). Likewise, snakes from CC differ from those in MV ($P = 0.001$), although the low R values observed in males ($R = 0.14$, Table 3.2a) indicates some degree of morphological overlap.

(a)	n	MNCA	CICA	PCR	CH	CCP	DRN	PC	MV	CC
MNCA	73		0.66	0.48	0.00	0.73	0.81	0.89	0.49	0.50
CICA	31	0.001		0.04	0.47	0.01	0.05	0.36	0.22	0.17
PCR	26	0.001	0.061		0.34	0.10	0.21	0.63	0.21	0.28
CH	5	0.479	0.002	0.005		0.69	0.73	0.96	0.49	0.58
CCP	14	0.001	0.451	0.063	0.002		-0.02	0.47	0.27	0.28
DRN	8	0.001	0.288	0.012	0.004	0.558		0.37	0.47	0.45
PC	20	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003		0.52	0.43
MV	27	0.001	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001		0.14
CC	14	0.001	0.029	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	

(b)	n	MNCA	CICA	PCR	CH	CCP	DRN	PC	MV	CC
MNCA	86		0.70	0.35	0.06	0.73	0.70	0.84	0.36	0.30
CICA	51	0.001		0.16	0.51	0.17	0.09	0.38	0.40	0.29
PCR	33	0.001	0.008		0.29	0.29	0.40	0.67	0.24	0.20
CH	14	0.237	0.001	0.002		0.58	0.60	0.87	0.41	0.19
CCP	19	0.001	0.003	0.001	0.001		0.08	0.54	0.53	0.33
DRN	8	0.001	0.159	0.001	0.001	0.274		0.32	0.36	-0.03
PC	24	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.008		0.44	0.73
MV	50	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001		0.37
CC	11	0.002	0.002	0.016	0.005	0.001	0.576	0.001	0.001	

Table 3.2. ANOSIM results comparing *B. asper* males (a) and females (b) from nine physiographic regions. R-values are shown above diagonal (R=1, if all individuals within a population are more similar to each other than to any individual in another population, and R=0 if there is no difference between populations). P-values below diagonal (significance at $P < 0.05$, shown in gray). Region abbreviations as in Table 3.1.

Morphological variables that contribute to the distinction among *B. asper* from different biogeographic regions are depicted in Table 3.3. For both sexes, subcaudal scales separate snakes from South America (PC, MV, CC) from those in Lower Central America.

On the other hand, weak separation within Lower Central America samples (CICA, PCR, CCP, and DRN), is mainly driven by the effects of ventrals or blotch number (Table 3.3). The ventral number was also the variable that contributed most to differentiate MNCA with CICA and PC. The number of interriotal scales for the males helps differentiate MNCA with MV and CC, whereas the number of subcaudal scales allows differentiate MNCA with MV in females (Table 3.3).

Among the South American groups, subcaudal scales contributed to the difference between MV and CC groups in both sexes, whereas ventral scales discriminate PC males from those from MV and CC. The interriotal scales and the subcaudal scales allow PC females to be discriminated from MV and CC.

Molecular variation

We aligned 696 bp for Cytb and 626 bp for ND4. No indels or stop codons were observed, as expected for protein-coding mitochondrial regions. Of the 1322 bp, 152 were variable and were 109 parsimony informative.

The GTR + Γ +G was identified as the optimal model of sequence evolution under the Akaike Information Criterion. Our phylogenetic analysis based in mitochondrial sequences suggests at least four clearly distinct lineages with

(a)

	n	MNCA	CICA	PCR	CH	CCP	DRN	PC	MV	CC
MNCA	73		(40.0)	(33.4, 27.8)	NS	(39.2)	(36.5, 30.2)	(35.19)	(30.2, 29.3)	(29.8, 25.2)
CICA	31	V		NS	(38.9)	NS	NS	(43.6)	(33.5, 31.5)	(38.0, 30.1)
PCR	26	B,V	NS		(31.8)	NS	(33.3, 27.3)	(48.5)	(49.0)	(53.6)
CH	5	NS	V	B		(40.7)	(37.9, 31.1)	(37.3, 32.8)	(47.3)	(52.3)
CCP	14	B	NS	NS	B		NS	(52.9)	(39.5)	(43.7)
DRN	8	B,V	NS	S,I	B,V	NS		(59.7)	(39.9)	(44.2)
PC	20	V	S	S	S,V	S	S		(33.8, 32.4)	(33.2)
MV	27	I,B	S,I	S	S	S	S	V,S		(44.4)
CC	14	I,B	S,I	S	S	S	S	V	S	

(b)

	n	MNCA	CICA	PCR	CH	CCP	DRN	PC	MV	CC
MNCA	86		(42.8)	(30.2, 28.5)	NS	(41.5)	(34.4, 31.0)	(34.7)	(35.0)	(28.6, 26.3)
CICA	51	V		(37.0)	(36.7)	(36.5, 32.4)	NS	(47.3)	(35.7)	(29.5, 28.0)
PCR	33	V,B	I		(33.3)	(37.3, 35.7)	(38.1)	(40.0)	(52.2)	(33.3, 32.2)
CH	14	NS	V	B		(48.2)	(37.4)	(35.4)	(56.2)	(35.0)
CCP	19	B	I,B	B,I	B		(35.7)	(53.0)	(40.9)	(31.1)
DRN	8	B,V	NS	I	B	NS		(32.6, 31.9)	(33.0)	NS
PC	24	V	S	S	S	S	I,S		(29.2, 28.4)	(38.7)
MV	50	S	S	S	S	S	I	I, V		(41.2)
CC	11	I,V	S, V	S,I	S	S	NS	S	S	

Table 3.3 Contribution of morphological variables in the distinction of *B. asper* samples from various physiographic regions within the species distributional range. SIMPER analysis for males (a), and females (b). Below and above the diagonal the type of morphological variable and its contribution (%) are shown, respectively. Abbreviation: n = sample size; V, Ventral scales; B, Blotch number; I, Interrictal scales; S, Subcaudal scales; NS, no significant. Region abbreviations as in text. Gray area represent the difference in type of variable between males and females.

high Bayesian posterior probabilities (PP = 1.0 in all cases, Fig. 3.3): (1) one line is constituted by individuals from the Caribbean of Middle America [MNCA-CICA], (2) one that includes individuals from the Pacific slope of Costa Rica [PCR], (3) one that includes individuals from Darien and the Chocoran region [DRN-PC], and (4) a fourth lineage that includes localities in the Caribbean Coast and the Magdalena Valley of Colombia [CC-MV]). Although the molecular identity of samples from CH and CCP is unknown at present, the pattern determined from this analysis differs from the pattern depicted by morphological analysis.

Average p-distances uncorrected among groups and within groups of analyzed *B. asper* specimens are shown in Table 3.4. Mean divergence among groups ranged from 0.4% (between DRN and PC) to 6.3% (between MNCA and PCR). Within Middle American samples, MNCA and CICA groups are more genetically similar (3.4%) than either one is with PCR (6.2% and 5.2%, for MNCA and CICA respectively) and DRN groups (5.2% and 4.3%, for MNCA and DRN respectively).

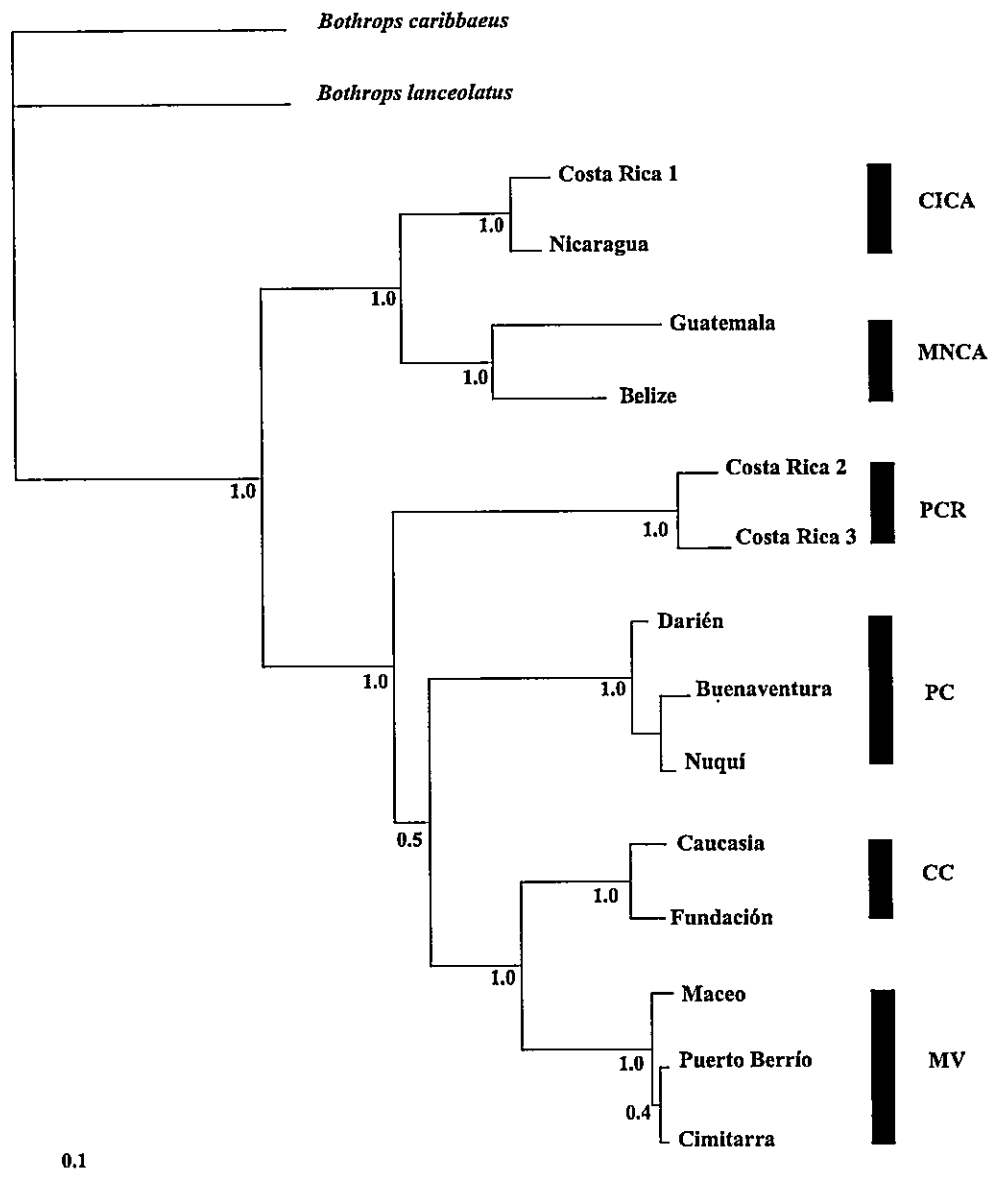


Figure 3.3. Bayesian phylogenetic and posterior probabilities for groups based on the combined two – gene data set analyzed under the GTR+ Γ +G model. Tip labels include country or specific locality where *B. asper* specimens were sampled (Appendix 3.2). Group abbreviations as in text.

	Groups							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Outgroup		0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
2 MNCA	0.068		0.006	0.010	0.009	0.008	0.009	0.009
3 CICA	0.064	0.034		0.010	0.008	0.008	0.009	0.008
4 PCR	0.070	0.063	0.058		0.007	0.008	0.009	0.009
5 DRN	0.067	0.052	0.043	0.037		0.008	0.009	0.009
6 PC	0.071	0.053	0.042	0.042	0.004		0.007	0.007
7 MV	0.063	0.057	0.046	0.041	0.026	0.030		0.004
8 CC	0.069	0.059	0.046	0.044	0.033	0.034	0.014	

Table 3. 4. Mean (below diagonal) and Standard error (above diagonal) of sequence divergence (p distance) among *B. asper* groups and outgroup (*B. caribbaeus* and *B. lanceolatus*).

Correlation with ecological factor

The wide distributional range of *B. asper* in Middle and South America includes localities that varied not only in latitude and longitude, but that experience a great divergence in environmental parameters, including temperature, precipitation, and patterns of rainfall. Sampled localities range in latitude from 24°56'34.06"N in Tamaulipas (Mexico) to 4°57'54.11"N in Novita municipality (Chocó, Colombia). However, mean annual precipitation ranges from 550 mm in Mexico to 8000 mm in Lloró (Choco, Colombia). Likewise, the number of dry months ranged from 0 in PC and some localities of CICA to 8 in Cortez (Honduras), and mean temperature varied from 16.5 °C in Olancho

(Honduras) to 28°C in several localities of Caribbean Cost in Colombia (Appendix 3.3). Localities that exhibit lowest mean precipitation have the longest dry season ($r_s = -0.682$, $P < 0.001$).

For males and females considered separately, morphological similarity is higher among regions that are in close proximity geographically. Not surprisingly, close regions share similarities also in precipitation and rainfall regime (Table 3.5), and therefore these two variables are also correlated with morphological distances (Table 3.5). The effects of precipitation and number of dry months over morphological distance persist even after removing the effects of geographic proximity (Table 3.5). In general, precipitation level is negatively correlated with the number of interribral scales, the number of ventral scales, blotch number, and subcaudal scales ($r_s < -0.246$, $P < 0.001$ for all correlations).

For both sexes, our analyses reveal weak correlation between morphological distances and mean annual temperature (Table 3.5). On the other hand, genetic divergence among regions, inferred from mtDNA sequences, is not related to snake morphological distance (Table 3.5), nor to any of the environmental variables included in these analyses.

Comparison matrices	Sex	r	P
Mantel Test:			
Morphological distances vs External factors			
Morphological vs Geographic	M	0.332	<0.001
	F	0.311	<0.001
Morphological vs Dry months*	M	0.237	<0.001
	F	0.263	<0.001
Morphological vs Precipitation**	M	0.434	<0.001
	F	0.370	<0.001
Morphological vs Temperature***	M	-0.125	<0.001
	F	-0.093	<0.001
Precipitation vs Geographic	M	0.210	<0.001
	F	0.190	<0.001
Dry months vs Geographic	M	0.132	<0.001
	F	0.180	<0.001
Temperature vs Geographic	M	0.104	0.002
	F	0.102	<0.001
Dry months vs Precipitation	M	0.400	<0.001
	F	0.401	<0.001
Parcial Mantel Test			
Morphological X dry months X Geographic	M	0.207	<0.001
	F	0.222	<0.001
Morphological X precipitation X geographic	M	0.331	<0.001
	F	0.332	<0.001
Morphological X temperature X geographic	M	-0.127	<0.001
	F	-0.132	<0.001
Mantel Test: Genetic distance vs Morphological and External factors			
Genetic vs Morphological		-0.001	0.500
Genetic vs Geographic		0.050	0.389
Genetic vs Dry months		0.109	0.162
Genetic vs Precipitation		0.165	0.147
Genetic vs Temperature		0.026	0.378

Table 3.5. Matrix correlation table, Mantel tests using 10000 iterations. Abbreviation: r, correlation coefficient between matrices; P, probability.

Except for the relationship between subcaudal scales in males and the number of dry months, all other meristic characters exhibit a positive correlation with latitude and number of dry months: (a) Ventral scales: latitude ($r_s > 0.625$, $P < 0.001$, for both sexes); number of dry months ($r_s > 0.515$, $P < 0.001$, for both sexes). (b) Interrictal scales: latitude ($r_s > 0.392$, $P < 0.001$, for both sexes); number of dry months ($r_s > 0.193$, $P < 0.006$, for both sexes). (c). Blotch number: latitude ($r_s > 0.523$, $P < 0.0001$, for both sexes); number of dry months ($r_s > 0.324$, $P < 0.0001$, for both sexes). (d) Subcaudal scales: latitude ($r_s > 0.2000$, $P < 0.010$, for both sexes); number of dry months (females: $r_s = 0.293$, $P < 0.0001$; males: $r_s = 0.120$, $P = 0.091$). On the other hand, body length do not changes in localities at different latitudes (females: $r_s = 0.062$, $P = 0.608$, $n = 70$; males: $r_s = 0.082$, $P = 0.516$, $n = 65$).

From these results, we conclude that in general, reduced precipitation and increased latitude and number of dry months are correlated with higher number of interrictal scales, ventral number, subcaudal scales, and blotch number.

Discussion

Morphological versus molecular variation

The pattern of phenotypic variation revealed in this study is roughly congruent between sexes and it shows important distinction between snakes from MNCA and CH and those from Lower Central. Snakes from all three regions separated by the Colombian Andes are also distinct, and they differ substantially from those from Middle American localities.

On the other hand, four distinct evolutionary lineages that vary in their level of divergence are evident within *B. asper*. The first lineage considered, from Caribbean Middle America (MNCA and CICA), show high levels of mean sequence divergence from samples that arise on the Pacific slope Costa Rica, Darién and Colombia ($5.2 \pm 0.74\%$). The Caribbean distribution of *B. asper* in Middle America extends continuously along the coastal lowlands of the Gulf of Mexico, the Yucatan Peninsula and Central America, and currently there is no evident barrier that might prevent gene flow along these regions. Nevertheless, sequence divergence between MNCA and CICA is comparatively high ($3.4 \pm 0.9\%$).

Currently no obvious geographic barrier restricts gene flow between MNCA and CICA populations, but these regions were separated until late Pliocene by

the Nicaraguan depression (Sasa, 2002; Savage, 2002). Thus, contact between populations in MNCA and CICA might be a relatively recent event.

A second lineage includes samples from PCR. Localities within this region are separated from those in CICA by the Cordillera de Talamanca, the longest mountain range in Costa Rica and Panama that has a mean elevation that exceeds 2,500 m. This range imposes an elevation barrier to the dispersal of *B. asper*, and accordingly might restrict gene flow between Caribbean and Pacific populations of this species (Table 3.5, but see Sasa and Barrantes, 1998). However, phenotypic differentiation between these regions is weak. Sequence divergence between PCR and samples from Darien and Colombia are also relatively high ($4.1 \pm 0.29\%$), thus supporting the distinctiveness of the PCR populations.

A third lineage is composed of samples from DRN and PC, and therefore represents the Chocoan region. This biogeographical region extends to the Pacific coast, starting in eastern Panama, and continuing along western Colombia and northern Ecuador, and is characterized by low elevations (<300 m) and by high precipitation that allows the development of a rainforest with high levels of regional endemism (Kattan et al., 2004; Ron, 2008). No evident geographic barrier might prevent gene flow between PC and DRN *B. asper*

populations, although some phenotypic differences were observed between them. Furthermore, mean sequence divergence between Chocoan populations and other Colombian groups is relatively high ($3.1 \pm 0.36\%$), and they are separated by the Cordillera Occidental and the Cordillera Central. These mountain ranges attained maximum elevation during Pliocene (2 to 5 mya) with an uplifting rate up to 3 mm/year during that period (Gregory-Wodzicki, 2000). Thus, it is probable that during this period much of the observed divergence between Chocoan and cis-Andean populations arise, as has been observed in other taxa (Cheviron et al., 2005; Noonan and Wray, 2006).

The fourth and last lineage considered is composed of samples from CC and MV that show low levels of sequence divergence ($1.4 \pm 0.4\%$), although they exhibit some weak phenotypic differentiation. Gene flow between MV and CC *B. asper* populations might be possible along the Magdalena River Basin.

Therefore, phenotypic differentiation is not congruent with the phylogenetic relationships observed at the intraspecific level in *B. asper*, and other hypotheses should be invoked to explain morphological variation.

Effects of environmental factors and adaptation

In Middle America, dry conditions (lower precipitation, longer dry season) decrease from west to east (Pacific to Caribbean) and increase from south to north (Vargas 2004). In contrast, in Colombia the rainfall is greater in the Pacific lowlands (mean precipitation > 3000 mm) and diminishes northward to the Caribbean region (Appendix 3.3). Hence, the driest localities in the range of *B. asper* are those in MNCA, CH, PCR, and CC (mean precipitation <2200 mm, <2250 mm, <2450 mm, and <2500 mm, respectively). In addition, individuals from these same regions show the greatest number of scales and dorsal blotches.

The correspondence between dryness and number of scales is known in other species of Squamata (Soulé and Kerfoot, 1972; Thorpe and Baez, 1987; Brown et al., 1991; Malhotra and Thorpe, 1997), and may comprise a causal effect of the environment (Castellano et al., 1994).

In one hand, environmental conditions during pregnancy are known to have an effect in some scale numbers in snakes (Fox, 1948; Osgood, 1978; Lourdais et al., 2004). For instances, Osgood (1978) induced changes in scutellation at various treatments of temperature during embryonic development in *Natrix fasciata*. However, the magnitude of differences observed in his experiment was less than one standard deviation from the mean, a much smaller difference than

the observed variation in nature. Furthermore, several researchers (Arnold, 1988; Arnold and Peterson, 1989) suggest that environmental induction might contribute minimally to phenotypic variance in snakes, and is not likely the sole cause of this phenomenon.

Alternatively, phenotypic variation in the scale number of *B. asper* might have an adaptive origin, and be a consequence of selection acting to confront local environmental conditions (Castellano et al., 1994). For instance, Soulé and Kerfoot (1972) suggested that morphological differences observed in the spiny lizard *Sceloporus graciosus* result from local adaptation to thermoregulation, whereas Horton (1972) indicate that in different skink species genus *Ergenia* differences result from the control of water loss.

According to Bently and Schmidt-Nielsen (1966), between 25 and 50% of the water loss in lizards and snakes is cutaneous, depending on the species, physiological state, and environmental conditions. For this reason, scutellation determines the surface area of skin that is exposed to the environment (Soulé and Kerfoot, 1972), and in general, interstitial area is inversely related to the number of scales and proportional to scale size. Thus, an increase in scale number might reduce the skin surface area exposed and in this way allows better protection against water loss in drier climates.

Sanders et al., (2004) indicate that this adaptation might be important in vipers that require distending the body while consuming large prey items, thus increasing and exposing interstitial skin surface area. In *B. asper*, selection might act in a similar way to facilitate water preservation in drier localities.

Extent of ecotypic variation and final remarks

If selective forces shape morphological variation, they might also account for the taxonomic confusion of *B. asper* and related species. For instance, Markezich and Taphorn (1993) failed to distinguish between *B. asper* and *B. atrox* in a suspected zone of sympatry in western Venezuela, and suggested that the phenotypic variation found "may be caused by heterogeneous selection pressures associated with these varied communities operating on a particularly broad genome" (Markezich and Taphorn 1993). Hence, statistical overlap observed in traits traditionally used in classification of lanceheads (Wüster et al. 1996, Gutberlet and Harvey, 2004) might result from ecological convergence and thus, the taxonomic value of these characters must be regarded with caution.

Our analysis suggests that selection can act at very subtle levels of environmental differentiation. As new evidence accumulates on the biological impacts of global climate change (Parmesan and Yohe, 2003; Root et al., 2003) it

is tempting to speculate that morphological differentiation in *B. asper* (and other snakes) could be affected by climate changes acting at regional scales (Hulme and Sheard, 1999; Zwiers and Zhang, 2003). Millen et al. (2006) suggest that ecotypic variation (observed geographical variation in response to variation in the local environment) can also be influenced by climate change. This view is evidenced by the changes in body size in several contemporary species attributed to climate change (Smith and Betancourt, 1998; Yom-Tov, 2001; Yom-Tov et al., 2006), and climate change is predicted to have an even greater impact on animal morphology and ecology in the future (Hughes, 2000; McCarty, 2001; Kinnison and Hendry, 2001; Hairston et al., 2005).

In conclusion, our analysis demonstrates that phenotypic variation in *B. asper* might be an adaptive response to differences in dryness at a local scale. The effects of environmental factors in shaping morphological characters in lanceheads should be considered if proper understanding of character evolution and reliable species identification is desired, especially in cases of taxa that are broadly dispersed over variable environments.

Acknowledgements

We thank the curators and personnel of the museums cited in the text; specially to Jonathan A. Campbell (University of Texas at Arlington); Janeth Lucía García, Vitelbina Núñez and Jorge Enrique Asprilla (Programa de Ofidismo/Escorpionismo, Universidad de Antioquia); Vivian Páez and Juan Pablo Hurtado (Museo de Herpetología, Universidad de Antioquia); Danilo Chacón, Santos Rodriguez, Fabian Bonilla, and Aaron Gómez (Instituto Clodomiro Picado) for allowing us to use specimens under their care. Frank F. Joyce and William W. Lamar review the manuscript and provide important suggestions to improve it. Permits for tissue samples came from Javier Guevara (Oficina Ventanilla Unica, MINAE, Costa Rica) and Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales, Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia (Resolución No. 1392 del 01 de agosto del 2008 to MMSC). Data presented here was partially funded by a doctoral grant from CONICYT to MMSC (Proyecto Beca AT-24060101) and a grant from Vicerrectoría de Investigación, UCR 741-A5-050 to MS.

Appendix 3.1. Material examined

Abbreviations of the Institutions:

AMNH: American Museum of Natural History, 79th St. & Central Park West, New York, New York 10024. **CAS:** California Academy of Sciences, Golden Gate Park, San Francisco, CA 94118. **FMNH:** Field Museum of Natural History, Roosevelt Road & Lake Shore Dr., Chicago, IL 60605. **ICP:** Instituto Clodomiro Picado. **MHUA:** Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, Calle 67 No. 53-108. **MUTCH:** Museo Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Colombia. **KU:** University of Kansas, Museum of Natural History, Lawrence, Kansas 66045. **LACM:** Los Angeles County Museum of Natural History, 900 Exposition Blvd, Los Angeles, CA 90007. **MVZ:** University of California at Berkeley, Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, CA 94720. **SUA:** Serpentario Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, Carrera 50ª No. 63-65. **TCWC:** Texas A&M University, Texas Cooperative Wildlife Collection, College Station, TX 77843. **USNM:** National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, D.C. 20560. **UTA:** University of Texas at Arlington, Merriam Museum Arlington, TX 76019.

Bothrops asper. Belize: Manatee Rd. (FMNH 3480, 4197); Cayo: Privason Creek, Mountain Pine Ridge (AMNH126449,126450; 0.4 mi S Belmopan on

Hummingbird Hwy (KU 157657); Toledo: Blue Creek Village (UTA R-11072).

Colombia: Acandí (MHUA 14065); Alto Baudó (SUA 203); Apartadó (SUA 983, 980); Bahía Solano (SUA 1223, 1406, 1405); Cáceres (SUA 2256); Caracolí (SUA 1404, 1773, 2995); Carepa (SUA 1113, 1178, 1298 ,1300, 3241, 1178, 1300, 3241); Caucasia (MHUA 14447; SUA 816, 978, 460, 957, 2375, 986, 1380, 2321, 2379,2698); Chigorodó (SUA 1169, 1170, 1172, 1216, 1334); Cimitarra (SUA 390, 932, 1506, 1691, 1875, 2388, 2446, 2464); El Bagre (SUA 1405); Gómez Plata (SUA 3318, 3319); La Victoria, Caldas (MHUA 14322, 14385, 14444); Ibagué (SUA 2990); Ístmina (SUA 312, 313, 1861); Lloró (SUA 3818; MUTCH 001, 008); Maceo (SUA 1681, 3123); Murindó (SUA 1622, 1623); Mutatá (SUA 255); Necoclí (SUA 2937); Novita (MUTCH 003, 004, 007); Nuquí (MHUA 14034, 14437, 14438); Ocaña (SUA 3395); Planeta Rica (SUA 2909); Porce (SUA 298, 320, 3323, 3367); Posamanza (SUA 545, 544, 600, 1575, 1576); Puerto Berrío (SUA 215, 234, 402, 557, 616, 658 , 776, 1278, 1689, 2119, 2243, 2633, 2680, 2720, 2721, 3375); Puerto Nare (SUA 1381, 1311); Puerto Triunfo (SUA 497); Puerto Valdivia (SUA 2696); San Carlos (SUA 2040, 2043, 2237, 2296, 2344, 2416, 2978); San Francisco (SUA 772); San José del Nus (SUA 3137); San Luis (SUA 420, 1986, 2359, 2386, 2783, 2875); San Miguel (SUA 3783); San Rafael (SUA 2307, 3333, 3605); Sonsón (SUA 2782); Tierralta (SUA 2273, 2293; MHUA 14327, 14328); Turbaco (SUA 3849,

3850); Turbo (SUA 453, 1313, 1382); Usiacurí (MHUA 14187); Vegachí (SUA 1774, 2712, 2732, 2784, 3346, 3355, 3626, 3641, 3654, 3710); Vigía del Fuerte (SUA 1613, 1686); Yalí (SUA 1508); Yolombó (SUA 3050); Yondó (SUA 744). Costa Rica: Alajuela: Santa Clara (AMNH12770); Ciudad Quesada (LACM 114147-48); Cartago: Turrialba (AMNH 69720; KU 30963, 30999, 31008, 34007, 56004); Moravia de Turrialba: (KU 63197); Pavones (UTA R-12921-27, 12931-38, 14507-10); Guanacaste: Tenorio: Finca Las Flores (KU 34008-10); Heredia: Paso Azul (AMNH 17337, 17386), Puerto Viejo (KU 103908, MVZ 206329), La Virgen (KU 63915); Sarapiquí (ICP 1391,, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405); Limón: Limón (AMNH 17380, 17382, UTA R-34157), Guápiles (AMNH 64448), Tortuguero (AMNH 89163-65, LACM 131113), Penshurt (AMNH 99681), El Diamante (KU 25677), Linda Vista de Siquirres (UTA R-12996); Puntarenas: Pto. Jiménez (AMNH 17278), 4.5 km Rincón de Osa (KU 102537, LACM 114149), 14 km NW Buenos Aires (KU 63916), Golfito (LACM 59196), Río Peñas Blancas (UTA R-32494); San José: no other locality (AMNH 17384); Bajo Perez (ICP 1306-09, 1311, 1314-16, 1318, 1322-26, 1329-30, 1332, 1336, 1341-1346, 1348, 1352-55, 1358, 1360-61); Siquirres (ICP 1362-72, 1374, 1386-90). Guatemala: Alta Verapaz: Sierra de Las Minas, Pueblo Viejo (UTA R-26636, 26638, 26640), 1 km S (air) Finca Tinajas (UTA R-26637); Escuintla: S Slope

Volcán de Agua, Finca Rosario Vista Hermosa (UTA R-21877-78, 21882, 21885, 21886-91, 21893-4, 21898-901, 21906); Izabal, Los Amates, Sierra del Espíritu Santo (KU 191151-52, UTA R-28620), Montañas del Mico, WSW Puerto Santo Tomás, Las Escobas (KU 191154-58, 191503, UTA R-14531, 21905, 23062); Las Dantas, El Estor (MVZ 160504-05, UTA R-8834, 15651, 21872), Mariscos (UTA R-21873), Canoas (UTA R-21907), Sierra de Santa Cruz, Finca Semuc, 1 km rd S headquarters (UTA R-26643-44), Morales, Sierra de Caral, Aldea Negro Norte (UTA R-37430); Petén: 25 km Flores (AMNH 110664-65), Sojío, 12 km S of La Libertad (AMNH 69972), 8 mi S Uaxactún (KU 157658), Tikal (UTA R-22226, 35017), 15 km NW Chinajá (KU 55704), Sayaxché (KU 57138), Quiriguá (AMNH 122764); Quetzaltenango: Finca El Carmen, km 197 on CA-2 (UTA R-21904).

Honduras: Atlántida: Quebrada de Oro (KU 200507); Copán: Quebrada Grande (KU 200621); Cortez: Agua Azul (AMNH 26151); Lancetilla (AMNH 46952); Olancho: Sierra de Agalta (FMNH 236415); Toro: 6 km S El Progreso (MVZ 171546), no other locality (AMNH 29965, 32573); Mexico: Chiapas: Mal Paso (TCWC 21546), La Esperanza (AMNH 66455, USNM 110433), Ruinas de Palenque (KU 94137, USNM 110430, Chicharras (USNM 46602), Sabana de San Quintín (KU 94138); Oaxaca: Temescal MVZ 78100), 10 mi S Oaxaca (MVZ 150506), Santo Domingo (USNM 47931-32), 12.7 km Valle Nacional Bridge

(UTA R-14529), Sierra Juárez, Metates (UTA R-14530, 25850); Puebla: Hueytamalco (AMNH 123919); San Diego (AMNH 58225), Vegas de Suchi (AMNH 58231), Necaxa, Río Necaxa (AMNH 76433); Quintana Roo: Xkanha, boundary of Campeche and Quintana Roo (AMNH 7860), 9 km W Puerto Juárez (KU 70908), 12 km N of Tulum (CAS 150329-30, UTA R-17095), Pueblo Nuevo X-Can (KU 70907), 17.9 mi NE Felipe Carrillo (KU157659, 171742), 8.1 mi SW Vicente Guerrero (KU 157661), 22 km N Kantunil Kin (KU 171758), Caobas, 86 km W Chetumal (KU 75003), Cancún Airport (MVZ 160199), between Tulum and Coba at km 14 (UTA R- 17031); San Luis Potosí: Antigua Morelos, Salto de Agua (TCWC 6974, AMNH 110389, KU 24033), Chapulhuaco, Hidalgo (AMNH 67315), 2 mi W Tamuin (AMNH 93434), 10 mi W Ebano (KU 24032), Xilitla region (KU 24080); Tabasco: Zapato Junction (CAS 114091), 14 mi NE Macultepec (KU 157662), Teapa (USNM 46406), no other data; Tamaulipas: no other data (CAS 71773), Río Sabinas (LACM 20229-31); Veracruz: Río Quetzalpan (TCWC 19157), 2 mi E Tabarca. Lago Catemaco (TCWC 21394, MVZ 76142), 2 km NW Sontecomapan (TCWC 21395), Los Tuxtlas (TCWC 21396, 21912), 21 mi E Las Chaspas (TCWC 21397), Palmilla, Tlacopayan (AMNH 4290), Veracruz (AMNH 79034), Tezonapa (CAS 74396), SW Jesus Carranza (KU 23915, 23995-97, 27008), 20 km ENE Jesús Carranza (KU 27009-11,

27565-67), Paso del Macho (KU 26473), Mirador (USNM 25047-48, 25212), Orizaba (USNM 30220), San Rafael (USNM 32149), 7 km NW Sontecomapan (UTA R-2748, 2920, 3021, 3063, 9444, 9460), W slope Santa Marta (UTA R-3010), 12 mi NW Tuxpan (AMNH 93435), Mirador (USNM 25046); Yucatan: 12 mi S Río Lagartos (KU 75004); Campeche: Encarnación (FMNH 105314-16), 8 km N Xpujil (KU 75001); no other data. Nicaragua: Zelaya: El Recreo (KU 112957-58, 125013), Cukra trail to Kanawa (AMNH 12705), Kanawa (AMNH 12708), Bluefields (AMNH 12707-09), Cupitna Camp (AMNH 12711-12), Río Huahuasban (AMNH 70244), Río Cama (AMNH 7413), Kyras, Musawas Waspues River (AMNH 75221); Panama: Bocas del Toro: Río Changuinola, Queb. Guabo, 16 km W Almirante (AMNH 119093-95, KU 107849), Río Chico (AMNH-64447), Península Valiente (KU 96986); Chiriquí: no further data (MCZ 26882-94), 16 mi W Potrerillos (MVZ 35563-67), Panamerican Highway, 27 mi NW David (MVZ 78768); Cristóbal (AMNH 36189); Darién: Río Subcutí (AMNH 36209), Turia Valley (CAS 71738-41), Río Tuirá at Río Mono (KU 97031, 107853-56), El Real (KU 107857-58, 80603), Río Chucunaque, 7 km above Río Mortí (KU-107859-62), Santa Fe, Río Sabana (KU 112571), Yaviza (MVZ 83439-40); Panamá: Altos de Maja (AMNH 109640), Barro Colorado Island (AMNH 63409, 85616, MVZ 78076), Canal Zone, Ft. Clayton (AMNH 81974,

FMNH 31743, KU 107850-52, 112572), Canal Zone, Curundu (KU 75765, 80276-81), Midbasin Chagres and mouth of Piquini River (MCZ 37086-88), Tocumen Airport, Panamá (MVZ 78769); San Blas: Camp Sasardi (KU 112569), Camp Summit (KU 112570).

Appendix 3.2. Origin and vouchers of samples used in molecular analyses included in this study.

<i>Specie</i>	<i>Locality_Country</i>	<i>Voucher</i>	<i>Cytb, ND4</i>
<i>B. caribbaeus</i>	Grande Anse, Saint Lucia		AF292598, AF292636
<i>B. lanceolatus</i>	Martinique		AF292599, AF292637
<i>B. asper</i>	Metagalpa, Nicaragua	ENS 9834	FJ985705
<i>B. asper</i>	San Carlos, Alajuela, Costa Rica	ICP 0404	FJ985706, FJ985716
<i>B. asper</i>	Quebrada Ganado, San José, Costa Rica	MZUCR11152	AY223599, U41876
<i>B. asper</i>	Acosta, San José, Costa Rica	ICP Pac 0202	FJ985704
<i>B. asper</i>	Petén, Guatemala	ICP 1150	FJ985707
<i>B. asper</i>	Mile 38, Western Highway, Belize Zoo		A292600, AF292638
<i>B. asper</i>	Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia	INS B60	FJ985702, FJ985713
<i>B. asper</i>	La Changa, Darién, Panamá	ICP 1286	FJ985701, FJ985715
<i>B. asper</i>	Nuquí, Chocó, Colombia	MHUA 14438	FJ985703, FJ985714
<i>B. asper</i>	Caucasia, Antioquia, Colombia	MHUA 14447	FJ985699, FJ985711
<i>B. asper</i>	Fundación, Magdalena, Colombia	SUA 3971	FJ985700, FJ985712
<i>B. asper</i>	Cimitarra, Santander, Colombia	SUA 1691	FJ985698, FJ985710
<i>B. asper</i>	Maceo, Antioquia, Colombia	MHUA 14311	FJ985697, FJ985709
<i>B. asper</i>	Puerto Berrío, Antioquia	SUA 2721	FJ985696, FJ985708

Appendix 3.3. Specimen localities and climate information.

The first number correspond to latitude (UTM), the second is longitude (UTM), the third is mean annual precipitation (in mm), the fourth is mean annual temperature (in °C) and, the fifth data correspond to number of dry months per year (see Material and Methods), reported in each locality. Sources for climate data are as follow. Belize: National Metereological Service (NMS, <http://www.hydromet.gov.bz>). Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDeAm) de Catalogo de Publicaciones Web (<http://www.ideam.gov.co>). Middle America, Vargas (2004). Costa Rica: Solano and Villalobos, 2001. Guatemala: Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología (<http://www.insivumeh.gob.Gt>). México, Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del agua (CONAGUA) (http://smn.cna.gob.mx/smmpt/smn_a2.html). Panamá: Hidrometeorología, (<http://www.hidromet.com.pa>).

Belize: Cayo: 16.8327, -90.3026, 1800, 26.1, 2; Toledo: 16.2490, -88.8682, 1800, 26.1, 2. **Colombia**: Acandí: 6.8703, -75.1664, 3000, 28.0, 0; Alto Baudó: 5.7098, -76.9927, 5000, 28.0, 0; Apartadó: 7.8813, -76.6517, 3180, 27.2, 0; Bahía Solano: 6.2226, -77.4012, 4982, 25.6, 0; Cáceres: 7.5800, -75.3500, 1032, 28.0, 4; Caracolí: 6.8703, -75.1664, 3000, 27.0, 3; Carepa: 7.7700, -76.6600, 4000, 28.0, 2; **Caucasia**:

7.9900, -75.2100, 1032, 28.3, 4; **Chigorodó:** 7.6622, -76.6861, 5000, 28.0, 2;
Cimitarra: 6.3175, -73.9521, 2700, 28.0, 1; **El Bagre:** 6.2960, -74.7262, 2176, 28.0, 1;
Gómez Plata: 6.6800, -75.2200, 3000, 28.0, 2; **La Victoria, Caldas:** 5.3167, -74.9125,
2500, 26.0, 0; **Ibagué:** 4.4500, -75.2400, 1800, 28.4, 0; **Ístmina:** 5.1437, -76.6801,
7000, 25.9, 0; **Lloró:** 5.5100, -76.6800, 8000, 28.0, 0; **Maceo:** 6.55, -74.7900, 3000,
23.0, 1; **Murindó:** 6.9658, -76.7502, 5000, 28.0, 0; **Mutató:** 7.2500, -76.4400, 2500,
28.0, 0; **Necoclí:** 8.4300, -76.7900, 3000, 27.4, 2; **Novita:** 4.9394, -76.6232, 8000,
28.0, 0; **Nuquí:** 5.7100, -77.2700, 7000, 26.0, 0; **Ocaña:** 8.2326, -73.3569, 863, 26.0, 5;
Planeta Rica: 8.4200, -75.5800, 2000, 28.3, 4; **Porce:** 6.5500, -75.2333, 3000, 28.0, 2;
Posamanza: 6.1300, 77.3200, 7000, 28.0, 0 **Puerto Berrío:** 6.5060, -74.3742, 3000,
28.2, 1; **Puerto Valdivia:** 7.2824, -75.3943, 2000, 28.3, 1; **San Carlos:** 6.1880, -
74.9904, 3000, 24.0, 2; **San José del Nus:** 6.2456, -74.9904, 3000, 28.0, 2; **San Luis:**
6.2644, -73.1509, 3000, 24.0, 1; **San Rafael:** 6.3049, -75.0249, 3000, 26.0, 2; **Sonsón:**
5.8700, -74.9400, 3000, 22.0, 1; **Tierralta:** 8.1800, -76.0788, 2000, 28.3, 4; **Turbaco:**
10.3400, - 75.4200, 793, 27.7, 4; **Turbo:** 8.0955, -76.7483, 3180, 27.2, 0; **Usiacurí:**
10.7399, -74.9840, 814, 27.4, 5; **Vegachí:** 6.7700, -74.8000, 3000, 23.0, 2; **Vigía del**
Fuerte: 6.7882, -76.9060, 7000, 28.0, 0; **Yalí:** 6.6408, -74.8541, 3000, 23.0, 3;
Yolombó: 6.6000, -75.0100, 2647, 21, 3; **Yondó:** 7.0048, -73.9286, 2799, 28, 1. Costa
Rica: **Alajuela:** 10.3792, -84.4404, 2100, 23.6, 4; **Bajo Perez, Acosta:** 9.8012, -

84.1617, 2370, 20.3, 4; **Cartago:** 9.8824, -83.6227, 23, 19.2, 2; **Guanacaste:** 10.4877, -85.3549, 2462, 27.1, 5; **Heredía:** 10.3778, -83.9601, 2000, 19.8, 3; **Sarapiquí:** 9.8418, -83.5972, 4000, 25.3, 0; **Limón:** 10.0700, -83.4500, 4860, 25.7, 0; **Puntarenas:** 9.2046, -83.3336, 2100, 27.0, 5; **San José:** 9.9365, -84.1000, 2000, 20.3, 5; **Siquirres:** 10.1014, -83.3705, 4000, 26.0, 0. **Guatemala:** **Alta Verapaz:** 15.5304, -90.1569, 1956, 26.8, 4; **Escuintla:** 14.1554, -98.9759, 1860, 27.2, 4; **Izabal:** 15.5197, -88.9274, 1676, 27.8, 3; **Petén:** 16.8845, -90.3144, 1800, 26.8, 4. **Honduras:** **Atlántida:** 15.5937, -87.1657, 2000, 21.2, 4; **Copán:** 14.8585, -89.0924, 688.8, 24.1, 6; **Cortez:** 15.4822, -88.0953, 800, 23.2, 8; **Olancho:** 14.7989, -45.7689, 1317.2, 16.8, 6. **Mexico:** **Campeche:** 19.7789, -88.4910, 1794.2, 25.8, 4; **Chiapas:** 16.0875, -92.7802, 2190.7, 24.1, 5; **Oaxaca:** 18.0882, -96.1232, 1618, 22.4, 5; **Puebla:** 20.1824, -101.2597, 1254, 20.1, 4; **Quintana Roo:** 19.1142, -88.4909, 1457, 27.9, 7; **San Luis Potosí:** 22.0949, -88.4909, 808.4, 21.0, 6; **Tabasco:** 21.8031, -102.9282, 2036, 26.4, 4; **Tamaulipas:** 24.1757, -97.8388, 738.8, 23.0, 4; **Veracruz:** 18.5910, -95.0180, 1830.1, 23.7, 2; **Yucatán:** 20.6968, -89.1051, 1084.0, 25.9, 5. **Nicaragua:** **Bluefields:** 12.0667, -83.7500, 4285, 0. **Panamá:** **Bocas del Toro:** 9.3339, -82.2550, 3752, 27.4, 0; **Chiriquí:** 8.3816, -82.3215, 2500, 27.0, 3; **Cristóbal:** 9.3698, -79.3798, 3000, 26.7, 3; **Darién:** 8.0707, -78.2016, 3000, 27, 3; **Panamá:** 8.2213, -78.2168, 3000, 26.7, 3; **San Blas:** 9.2331, -78.2260, 3000, 25, 3.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

A la luz de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, la discusión se desglosará de acuerdo a los objetivos planteados y estará relacionada con las principales preguntas y resultados obtenidos en los artículos que comprenden esta tesis (**ver tabla resumen**).

4.1. Taxonomía y relación filogenética entre *B. asper* y el grupo *atrox*

En este estudio fueron tomados datos moleculares y morfológicos de individuos de *B. asper* a lo largo de su rango de distribución y solo datos moleculares de las especies que conforman el grupo *atrox* (*B. atrox*, *B. isabelae*, *B. leucurus*, *B. moojeni* y *B. marajoensis*, *sensu* Salomão et al., 1997), procedentes de diversas localidades de Colombia, Venezuela, Brasil, Perú y Ecuador. Las especies que conforman el grupo *atrox* y *B. asper* son similares en apariencia especialmente en el patrón críptico de coloración y muestran solapamiento en caracteres merísticos, lo cual ha creado confusión taxonómica para asignar especies nominales (Campbell y Lamar, 2004). A nivel molecular, los trabajos de Wüster et al. (2002b) y Parkinson et al. (2002a) sugirieron la relación de grupo hermano entre las especies que conforman el grupo *atrox* y *B. asper*. Sin

embargo, en estos trabajos fue considerada solo una muestra de *B. asper* procedente de Mesoamérica y una (Parkinson et al., 2002a) o varias especies del grupo *atrox* (Wüster et al., 2002b). La filogenia interespecífica obtenida en este estudio con genes mitocondriales soportó la monofilia del grupo *atrox*. En este grupo se observaron dos clados, uno de ellos conformados por *B. atrox* y *B. marajoensis* y el otro conformado por *B. isabelae*, no obstante la posición filogenética de *B. moojeni* y *B. leucurus* no fue determinada. Los resultados de este estudio no permitieron establecer la relación filogenética entre las poblaciones de *B. asper* y el grupo *atrox* ni permitieron considerar a *B. asper* como grupo monofilético.

La politomía entre las especies que conforman el grupo *atrox* y los linajes de *B. asper* encontrada en este estudio podría ser resuelta con la incorporación de otros genes mitocondriales como la región control y algunos genes nucleares. Como se mencionó en el capítulo introductorio de esta tesis, la región control esta duplicada en serpientes (Kumazawa et al., 1998; Dong y Kumazawa., 2005). Según Kumazawa et al. (1998), el estado duplicado de la región control no es una característica transitoria o inestable hallada en un individuo en particular. Además, esta región presenta diferencias a nivel inter específico debido a que varía en cuanto a su posición, longitud y número (Yan et al., 2008). Por tanto, la

secuenciación de este gen podría darnos luces sobre las relaciones filogenéticas de las especies. Con respecto a los genes nucleares, diversos estudios en aves (Eberhard y Bermingham, 2004), mamíferos (Matthee et al., 2001; Matthee et al., 2004; Matthee y Davis, 2001; Willows-Munro et al., 2005) y reptiles (Sanders y Lee, 2007; Sanders et al., 2008), han encontrado filogenias más robustas al incorporar marcadores nucleares en sus análisis. Estos estudios han demostrado que estos marcadores presentan niveles bajos de homoplasia y son útiles para recuperar información de grupos taxonómicos que han experimentado eventos de radiación adaptativa rápida, como el ancestro del género *Bothrops* (Wüster et al., 2002a). Además, se hace necesario la incorporación de nuevas localidades que comprendan un mayor rango de distribución del grupo *atrox* y de *B. asper*, principalmente muestras procedentes de Panamá, Venezuela, Ecuador y Brasil.

4.2. Concordancia entre el patrón filogeográfico y morfológico de *B. asper* con atributos biogeográficos

El patrón de variación fenotípica entre los grupos preestablecidos de *B. asper* en este estudio, fue congruente entre sexos, pero no presentó correspondencia entre la variación morfológica y divergencia molecular. No obstante *B. asper* presenta dimorfismo sexual, la comparación entre los caracteres merísticos

medios en cada grupo y analizados en forma independiente para machos y hembras, generó el mismo grado de similitud o diferenciación entre los nueve grupos evaluados..

El análisis filogeográfico de los individuos de *B. asper* mostró seis linajes divergentes y concordantes con los rasgos fisiográficos presentes en Mesoamérica y en el norte de América del Sur. Los resultados moleculares mostraron que *B. asper* se distribuye en forma continua a lo largo de la región Caribe de Mesoamérica, conformando dos linajes comprendidos por individuos de México y América Central Nuclear (Guatemala, Belice y Honduras) y América Central Istmica (Nicaragua y Costa Rica), con una considerable divergencia genética entre ellos ($4.0 \% \pm 1.1$). Actualmente, no hay una barrera geográfica evidente que restrinja el flujo génico entre estos grupos. Sin embargo, estas regiones estuvieron separadas hasta el Plioceno tardío por la Depresión de Nicaragua (Sasa, 2002; Savage, 2002). Consecuentemente, el contacto entre estos dos grupos podría ser un evento reciente.

La variación morfológica a diferencia de los resultados obtenidos en el análisis molecular no mostró una similitud fenotípica a todo lo largo de la región Caribe mesoamericana. Los resultados mostraron diferenciación entre serpientes de México y América Central Nuclear y Chiriquí con los grupos de la

porción inferior de América Central (América Central Istmica Caribe, Pacífico de Costa Rica, Región Central y Caribe de Panamá y Darién).

Las Cordilleras de Guanacaste, Central y Talamanca constituyen una barrera geográfica entre las poblaciones de la región Caribe de Mesoamérica (linaje 1) y las poblaciones del Pacífico centro y sur de Costa Rica (linaje 3). Estos dos linajes (linaje 1 y 3) no constituyen grupos hermanos y divergieron `posiblemente durante el Plioceno y su diferenciación coincide con el máximo levantamiento de la Cordillera de Talamanca. Según la historia geológica de América Central, el levantamiento del rango montañoso de la porción baja de esta región fisiográfica (incluyendo la cordillera de Talamanca) ocurrió desde el Mioceno tardío a inicios del Plioceno (8-5 m.a.) y culminó en el Plioceno con el cierre del portal de Panamá (Ferrusquia-Villafranca, 1978, *sensu* Hasbún et al., 2005; Coates y Obando, 1996). Los resultados de nuestro análisis filogenético no muestran una relación de grupo hermano entre los linajes 1 y 3, lo cual sugiere que *B. asper* colonizó de manera independiente ambos lados de la Cordillera (Caribe y Pacífico). Estos resultados no son comparables con los obtenidos para otros taxa que muestran patrones similares de distribución a *B. asper*, en los cuales se ha sugerido que la existencia de eventos vicariantes pudieran explicar eventos de especiación en estos taxa (Crawford et al., 2007; Hasbún et al., 2005;

Zamudio y Greene, 1997). No obstante, la divergencia genética entre los linajes 1 y 3 (Caribe de América Central Istmica y Pacífico de Costa Rica) fue alta ($6.3\% \pm 1.5$), la diferenciación fenotípica es ausente en machos y muy baja en hembras de ambos linajes ($R = 0.16$). Una explicación plausible para el patrón observado corresponde a la similitud ambiental en ambas laderas de la Cordillera de Talamanca, caracterizada por niveles similares de precipitación y número de meses secos. en este caso es esperable convergencia fenotípica.

Los individuos que habitan el oriente de Panamá y el norte de América del sur (Colombia) conformaron tres linajes divergentes, los cuales presentaron correspondencia con la estructura fisiográfica de la Cordillera de los Andes. La cordillera de los Andes ha sido identificada como uno de los focos principales de diversificación de plantas vasculares, aves y anfibios (Gentry, 1982; Fjeldså, 1994; Duellman, 1999) que se distribuyen en América del Sur. Además, posiblemente constituye el primer evento vicariante que causó la divergencia entre la biota (Kattan et al., 2004); que habita en los bosques húmedos al occidente y oriente de los Andes. Según nuestros resultados moleculares no existe diferenciación genética entre los individuos procedentes del Darién y los individuos que habitan la región Pacífica en Colombia (linaje 4). Esta zona constituye un corredor biogeográfico que forma parte de la Eco-Región Chocó-

Darién. Esta Eco-Región se extiende a lo largo de la Costa Pacífica, comenzando en Panamá, y continua a lo largo del occidente de Colombia hasta el norte de Ecuador (Dinerstein et al., 1995). Esta región se caracteriza por presentar elevaciones bajas (<300 m) y un nivel alto de precipitación que permite el desarrollo de bosques de selva húmeda tropical con alto nivel de endemismo (Kattan et al., 2004; Ron, 2008). En esta región, no existe una barrera geográfica evidente que limite el flujo génico entre los individuos del Pacífico de Colombia y el Darién. Sin embargo fueron observadas diferencias fenotípicas entre ellas.

La Cordillera de los Andes en Colombia se divide en tres rangos montañosos, el Occidental, el Central y el Oriental (Kattan et al., 2004). Nuestros resultados no soportaron la relación de grupo hermano entre los linaje de la región Pacífica de Colombia y Panamá (linaje 4), con los linajes de la región Caribe y el Valle del Magdalena (linajes 5 y 6), lo cual no permite sugerir un evento vicariante asociado a las Cordilleras Occidental y Central. La fecha de divergencia estimada entre el linaje de la Vertiente Pacífica (linaje 4) y los linajes 5 y 6, sugiere que éstos grupos divergieron posiblemente durante el Plioceno. Estos resultados son concordantes con el período de máximo levantamiento de la Cordillera de los Andes estimado por Gregory-Wodzicki (2000). Según este autor, la altura de la Cordillera de los Andes del Norte se incrementó

rápidamente durante el Plioceno, entre 2 y 5 m.a. (elevaciones modernas alrededor de 2.7 m.a). El linaje 5 (región Caribe) está enmarcado por las estribaciones de las tres Cordilleras de los Andes, y éstas quizás limitan la dispersión de las poblaciones de la región Caribe de Colombia (linaje 5) hacia la Vertiente Pacífica (linaje 4). Los linajes 5 y 6 son grupos hermanos, con un nivel bajo de diferenciación fenotípica ($R = 0.14$) y divergencia genética entre ellos ($1.8\% \pm 0.08$). El nivel de divergencia podría ser explicado por la ausencia de una barrera geográfica evidente entre ambos linajes. Nuestros resultados moleculares sugieren que el tiempo de divergencia entre los linajes 5 y 6 podría ser en el límite del Plioceno-Pleistoceno ó durante el Pleistoceno. Por lo tanto, el linaje del Valle del Magdalena podría ser el resultado de un evento de dispersión reciente. Según nuestro análisis, este linaje presenta el nivel mas bajo de diferenciación genética y el largo de ramas mas corto. Además, presenta el menor índice de diversidad haplotípica.

En conclusión, la diferenciación fenotípica no es congruente con las relaciones filogenéticas observadas a nivel intra específico en *B. asper*. Por lo tanto, es necesario plantear otras hipótesis que podrían explicar la gran variación morfológica de *B. asper* a lo largo de su rango de distribución.

4.3. Efecto de factores ambientales y adaptación

El patrón de variación geográfica encontrada en *B. asper* en cuanto al número de interrietales, escamas ventrales, escamas subcaudales y manchas dorsales estuvo positivamente correlacionado con la latitud, y el número de meses secos, pero inversamente correlacionado con el nivel de precipitación. De esta manera, las poblaciones de México y América Central Nuclear presentaron mayor número de escamas ventrales en comparación con las poblaciones de la Vertiente Pacífica en Colombia. Niveles reducidos de precipitación se correlacionaron con un número mayor en escamas interrietales, escamas ventrales y número de manchas dorsales. En Mesoamérica, las regiones con menor nivel de precipitación fueron México, América Central Nuclear, y la Provincia de Chiriquí en Panamá, entre las cuales no hubo diferencias significativas en los caracteres merísticos analizados. América Central Istmica presentó niveles similares de precipitación, lo cual se demostró con el bajo nivel de diferenciación fenotípica encontrado entre los grupos. En Colombia, el régimen pluviométrico es mayor en la Vertiente Pacífica y va disminuyendo hacia el norte en la región Caribe, consecuentemente las poblaciones de la Vertiente Pacífica presentaron menor número de escamas ventrales, interrietales

y manchas dorsales que las poblaciones del Valle del Magdalena y la Región Caribe.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Sanders et al. (2004) para la víbora de fosa *Trimeresurus sumatranus* en los que una precipitación reducida, está correlacionada con un mayor número de escamas sobre la cabeza, el cuerpo y la cola. La correlación encontrada entre la latitud y el nivel de precipitación con el número de escamas, demuestran que la alta variación morfológica en *B. asper* es explicada por factores ambientales y no por barreras geográficas que limiten el flujo génico entre poblaciones.

Según Bentley y Schmidt-Nielsen, (1966), la vía primaria de pérdida de agua en los reptiles es la evaporación cutánea, por lo tanto la hipótesis con respecto a la importancia de las escamas en el balance hídrico es que el número y el tamaño de éstas determina la superficie del área de la piel que es expuesta a la atmósfera. Sanders et al. (2004), sugieren para el grupo *T. sumatranus*, que el incremento en el número de escamas produce una disminución en el área de la piel intestinal expuesta a la atmósfera debido a que el espacio entre escamas es más compacto, y de esta manera facilita la retención de agua en ambientes más calurosos y secos. Lo anterior permite plantear la hipótesis, que la variación morfológica encontrada en las poblaciones de *B. asper* representa una adaptación

a presiones de selección, probablemente para el balance hídrico, termorregulación o cripsis mas que un reflejo de la filogenia.

4.4. Implicaciones taxonómicas

La divergencia genética encontrada mediante los genes mitocondriales *ND4* y *Cyt b* entre las poblaciones del Pacífico de Costa Rica y Caribe de América Central Istmica (6.3%) fue equivalente o mayor que la distancia genética en la misma región mitocondrial entre varias especies de serpientes como *Lachesis stenophrys* y *L. melanocephala* (5.3%; Zamudio y Greene, 1997), el complejo *Naja nigricollis* (4.7% a 8.3%; Wüster et al., 2007), y algunas especies del género *Agkistrodon* (4.0% a 6.4%; Parkinson et al., 2000). Trabajos previos han demostrado que las poblaciones de *B. asper* que habitan a cada lado de la Cordillera de Talamanca presentan diferencias en la época reproductiva (Solórzano y Cerdas, 1989; Sensus Campell y Lamar 2004), variabilidad geográfica en los efectos farmacológicos del veneno (Gutiérrez et al., 1980) y en su composición (Alape-Girón et al. 2008). Las diferencias en el comportamiento reproductivo, la variabilidad geográfica del veneno y los resultados moleculares obtenidos en este estudio permiten plantear la hipótesis de una posible especiación alopátrica en estas poblaciones, debido al proceso orogénico de las

Cordilleras de Guanacaste, Central y Talamanca. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis basada en dos marcadores mitocondriales (De Queiroz, 1998; Moritz et al., 1992; Wake y Schneider, 1998) resulta imprescindible incorporar genes nucleares, aumentar el número de localidades ubicadas en ambas vertientes e incorporar en el análisis individuos de Panamá, principalmente de la zona occidental y central. En esta región, los individuos de *B. asper* que habitan en cada vertiente quizás convergen en una zona de contacto. Varios estudios filogeográficos de taxas que presentan un patrón de distribución similar a las poblaciones de *B. asper* en Mesoamérica, han demostrado que Panamá constituye una zona de contacto entre las poblaciones del Pacífico y Caribe de Costa Rica (*Craugastor crassidigitus* y *C. talamancae*, Crawford et al., 2007; *Physalaemus pustulosus*, Weigt et al., 2005).

4.5. Consideraciones finales

Bothrops asper no constituye un grupo monofilético y presenta una gran variación fenotípica a lo largo de su rango de distribución. Esta variación ha generado solapamiento en los caracteres merísticos que han sido utilizados frecuentemente en su clasificación. A la luz de nuestros resultados, en la variación fenotípica de *B. asper* están implicados diversos factores como fuerzas

selectivas, adaptación local, desacople entre morfología y moléculas y además, variación clinal.

Si los factores mencionados anteriormente determinan la variación fenotípica en *B. asper*, éstos deben ser considerados para explicar la confusión taxonómica existente entre *B. asper* y especies relacionadas, particularmente las especies que conforman el grupo *atrox*. Una manera de investigar la transición o cambio evolutivo de atributos morfológicos dentro de un contexto filogenético es mediante el uso del método comparado. Nuestros datos tienen dos limitantes para la realización de este análisis. El primero de ellos es la filogenia incompleta y el segundo, es la falta de rasgos en las especies asignadas al grupo *atrox* y los grupos externos. Por lo tanto, para inferir los estados ancestrales del patrón morfológico obtenido en *B. asper*, desarrollar hipótesis acerca de los procesos de cambio evolutivo y evaluar la existencia de asociación evolutiva entre dos o más caracteres que podrían sugerir procesos coevolutivos es necesario la incorporación de nuevos genes, un muestreo mas completo con la inclusión de individuos del occidente y centro de Panamá, y datos morfológicos de los grupos externos y de las especies asignadas al grupo *atrox*.

Preguntas	Art.	Resultados
¿ <i>Bothrops asper</i> a lo largo de su rango de distribución constituye un grupo monofilético?	I	Los resultados no permitieron establecer la monofilia de <i>B. asper</i> , debido a que la posición filogenética del grupo <i>atrox</i> con respecto a los individuos de <i>B. asper</i> de Mesoamérica y Colombia no estuvieron bien soportadas.
¿Dónde se originó <i>Bothrops asper</i> ?	I	El ancestro de <i>Bothrops asper</i> colonizó América Central Istmica (Costa Rica y/o Panamá) y desde allí <i>B. asper</i> colonizó el noroccidente de América del Sur.
¿Cuál es la zona de colonización más reciente en el área de distribución de <i>B. asper</i> ?	I	Las poblaciones más derivadas de <i>B. asper</i> habitan el Valle del Magdalena y la Región Caribe en Colombia. El tiempo de divergencia entre estos grupos corresponde al Pleistoceno, a diferencia de los grupos de la región Pacífica de Colombia, y Mesoamérica, los cuales divergieron durante el Plioceno.
¿Existe estructuración genética a lo largo del rango de distribución de <i>B. asper</i> , especialmente en zonas con cordones cordilleranos asociados?	I	<i>B. asper</i> presenta un alto grado de estructuración genética. A lo largo de su distribución se encontraron seis linajes divergentes, los cuales están en correspondencia con la historia geológica del área de distribución de esta especie en el Neotrópico (orogénesis de la Cordillera de Talamanca y la Cordillera de los Andes en Colombia y la Depresión de Nicaragua).
¿Existe una correlación entre la divergencia molecular y la variación morfológica en <i>B. asper</i> a lo largo de su rango de distribución?	II	No se observó correspondencia entre la variación morfológica y la divergencia molecular entre individuos que representan las regiones fisiográficas bajo estudio. La variación en caracteres merísticos de <i>B. asper</i> estuvo correlacionada positivamente con la latitud y el número de meses secos, pero inversamente relacionada con la precipitación.

Tabla resumen. Principales preguntas y resultados de los dos artículos incluidos en la tesis. I. Saldarriaga-Córdoba, M.M., Sasa, M., Méndez-Torres, M.A., 2009. Historical perspectives and origin of a deadly predator: The phylogeography of the lancehead pitviper *Bothrops asper* (Garman 1884) in the Neotropics. Saldarriaga-Córdoba, M.M., Sasa, M., Pardo, R., Méndez, M.A., 2009. II. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* i(Garman, 1884; Serpentes: Viperidae), Toxicon (doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las poblaciones de *B. asper* presentan un alto nivel de estructuración genética y fenotípica a lo largo de su rango de distribución y además, constituyen un linaje distinto de las especies que conforman el grupo *atrox*. Desde el punto de vista molecular, el patrón filogeográfico en *B. asper* coincide con los atributos fisiográficos presentes en Mesoamérica y en el noroccidente de América del Sur. En este sentido, las poblaciones que habitan la región Caribe de Mesoamérica (localidades ubicadas desde México hasta Costa Rica) son monofiléticas y presentan un alto nivel de diferenciación genética con respecto a las poblaciones que habitan el Pacífico de Costa Rica. Ambos linajes (Pacífico y Caribe) no constituyen grupos hermanos, por lo tanto su diferenciación genética no se debe a un efecto vicariante de las Cordilleras de Guanacaste, Central y Talamanca. Por el contrario, nuestros resultados sugieren que la divergencia genética podría ser el resultado de un evento de colonización independiente de ambos lados de las cordilleras. El tiempo de divergencia estimado entre estas dos poblaciones coincide con el periodo de máximo levantamiento de este sistema montañoso durante el Plioceno.

Las poblaciones de *B. asper* provenientes de Colombia, no constituyen un grupo monofilético y su patrón filogeográfico coincide con las vertientes y valles que hacen parte de la Cordillera de los Andes. El tiempo de divergencia estimado, sugiere que los eventos cladogénicos entre las poblaciones de *B. asper* de la Vertiente Pacífica con las poblaciones de la región Caribe y del Valle del Magdalena ocurrieron durante el Plioceno, lo cual es consistente con el periodo de máximo levantamiento de la Cordillera de Los Andes. Estos dos últimos linajes divergieron durante el Pleistoceno y dado que no presentan una barrera geográfica evidente entre ellos, la cladogénesis podría ser el resultado de un evento de dispersión reciente desde la región Caribe hacia el Valle del Magdalena.

Desde el punto de vista morfológico, la diferenciación fenotípica en *B. asper* es congruente entre sexos pero no refleja la historia filogenética. La variación en el número de escamas interrietales, escamas ventrales, escamas subcaudales y manchas dorsales estuvo positivamente correlacionado con la latitud, y el número de meses secos, pero inversamente correlacionado con el nivel de precipitación. Esto sugiere que en la variación morfológica de *B. asper* están implicados diversos factores como fuerzas selectivas, adaptación local y

variación clinal más que barreras geográficas que limiten el flujo génico entre los grupos

En relación al estado taxonómico de *B. asper*, el alto nivel de diferenciación genética entre las poblaciones del Pacífico y Caribe de Costa Rica, sumado a los antecedentes publicados sobre variabilidad en la composición del veneno y época reproductiva, nos permite plantear una hipótesis de especiación alopátrica. Para evaluar esta hipótesis se requiere incorporar otros genes mitocondriales como la región control, genes nucleares e incrementar el tamaño muestral con individuos procedentes de localidades del centro y occidente de Panamá, la cual podría ser una zona de posible contacto entre los individuos de las dos vertientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, Marieta., Madrigal M., Sasa, M., Calvete, J. J., 2008. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571.
- Alfaro, M.E., Karns, D.R., Voris, H.K., Brock, C.D., Stuart, B.L. 2008. Phylogeny, evolutionary history, and biogeography of Oriental-Australian rear-fanged water snakes (Colubroidea: *Homalopsidae*) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 576-93.
- Allsteadt, J., Savitzky, A.H., Petersen, C.E., Naik, D.N., 2006. Geographic variation in the morphology of *Crotalus horridus* (Serpentes: Viperidae). *Herpetological Monographs* 20, 1-63.
- Álvarez del Toro, M., 1960. Los Reptiles de Chiapas. Instituto Zoológico del Estado, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, 204 pp.
- Amaral, A., 1924. On the biological differentiation of the Neotropical species of snakes *Bothrops atrox* (Linne' 1758), *B. jararaca* (Wied 1924), and *B. jararacussu* (Lacerda 1884). *Am. J. Trop. Med* 4, 447–452.
- Amaral, A., 1929. Estudios sobre ophidios neotropicos. XVII. Valor sistemático de varias formas de ophidios neotropicos. *Mem. Inst. Butantan* 4, 3–68.

- Anderson, L.C., 2001. Temporal and geographic size trends in Neogene Corbulidae (Bivalvia) of tropical America: using environmental sensitivity to decipher causes of morphologic trends. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 166, 101-120.
- Aragón, F., Gubensek, F., 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon* 19, 797-805.
- Arévalo, E., Davis, S.K., Sites, J.W., Jr., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among 8 chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (*Phrynosomatidae*) in Central Mexico. *Syst. Biol.* 43, 387-418.
- Aris-Brosou, S., Yang, Z., 2002. Effects of models of rate evolution on estimation of divergence dates with special reference to the metazoan 18S ribosomal RNA phylogeny. *Syst. Biol.* 51, 703-714.
- Arnold, S.J., 1988. Quantitative genetics and selection in natural population: Microevolution of vertebral numbers in the garter snake *Thamnophis elegans*, In Weir, B.S., Eisen, E.J., , Goodman, M.M., Namkoong, G. (eds.), *Proceedings of the Second International Conference on Quantitative Genetics*. Sinauer, Massachusetts, pp. 619-636.

- Arnold, S.J., Peterson, C.R., 1989. A test for temperature effects on the ontogeny of shape in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Physiol. Zool.* 62, 1316-1333.
- Ashton, K.G., de Queiroz, A., 2001. Molecular systematic of the western rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-loop in phylogenetic studies of snakes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 176-189.
- Auffenberg, W., 1955. A reconsideration of the racer, *Coluber constrictor*, in eastern United States. *Tulane Stud. Zool.* 2, 89-155.
- Avice, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.
- Avice, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, second ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Axtell, R.W., Wasserman, A.O., 1953. Interesting herpetological records from southern Texas and northern Mexico. *Herpetologica* 9, 1-6.
- Bagnouls, F., Gaussen, H., 1957. Les climats biologiques et leur classification. *Ann. Geogr. Paris*.
- Barker, F. K., Lutzoni, F., 2002. The utility of the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* 51, 625-637.

- Behling, H., Hooghiemstra, H., Negret, A.J., 1998. Holocene History of the Chocó Rain Forest from Laguna Piusbi, Southern Pacific Lowlands of Colombia. *Quaternary Research* 50, 300-308.
- Bentley, P.J., Schmidt-Nielsen, K., 1966. Cutaneous water loss in reptiles. *Science* 151, 1547-1549.
- Bermingham, E., Martin, A.P., 1998. Comparative mtDNA phylogeography of Neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7, 499-517.
- Bittner, T., King, R., 2003. Gene flow and melanism in garter snakes revisited: a comparison of molecular markers and island vs. coalescent models. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 79, 389-399.
- Boada, C., Salazar, V.D., Freire-Lascano, A., Kuch, U., 2005. The diet of *Bothrops asper* (Garman 1884) in the Pacific lowlands of Ecuador. *Herpetozoa* 18(1/2).
- Bolaños, R., 1984. In: Rica, Universidad de Costa (Ed.), *Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamérica*. San José, Costa Rica, 137 pp.
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., 2002. zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *J. Stat. Softw.* 7, 1-12.
- Bos, D.H., Posada, D., 2005. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 211-227.

- Broughton, R. E., Stanley, S. E., Durrett, R. T., 2000. Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 49: 617-627.
- Brown, R.P., Thorpe, R.S., Baez, M., 1991. Lizards on neighbouring islands show parallel within-island microevolution. *Nature* 352, 60-62.
- Brown, R.M., Ferner, J.W., Diesmos, A.C., 1997. Definition of the Philippine Parachute Gecko, *Ptychozoon intermedium* Taylor 1915 (Reptilia: Squamata: Gekkonidae): Redescription, designation of a neotype, and comparison with related species*. *Herpetologica* 53, 357-373.
- Burbrink, F.T., Lawson, R., Slowinski, J.B., 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* , 2107-2118.
- Burbrink, F.T., Fontanella, F., Alexander Pyron, R., Guiher, T.J, Jimenez, C., 2008. Phylogeography across a continent: the evolutionary and demographic history of the North American racer (Serpentes: Colubridae: *Coluber constrictor*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 274-288.
- Burger, W.L., 1971. Genera of pitvipers (Serpentes: Crotalinae). PhD. Dissertation, University of Kansas, Lawrence, 186 pp.

- Cadle, J.E., 1985. The neotropical colubrid snake fauna (Serpentes: Colubridae): lineage components and biogeography. *Syst. Zool.* 34, 1-20.
- Calsbeek, R., Knouft, J.H., Smith, T.B., 2006. Variation in scale number is consistent with ecologically based natural selection acting within and between lizard species. *Evol. Ecol.* 20, 377-394.
- Campbell, J.A., 1998. Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, Yucatan and Belize. University of Oklahoma Press, Oklahoma, 400 pp.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 1989. The Venomous Reptiles of Latin America. Comstock, Cornell University, Ithaca, NY, 425 pp.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 1992. Taxonomic status of miscellaneous neotropical viperids with the description of a new genus. *OCC, Pap, Mus. Texas Teach Univ.* 153, 1-31.
- Campbell, J.A., Vannini, J.P., 1989. Distribution of amphibians and reptiles of Guatemala and Belize. *West. Found. Vertebrate Zool* 4, 1-21.
- Campbell, J.A., Smith, E.N., 2000. A new species of arboreal pitviper from the Atlantic versant of northern Central America. *Rev. Biol. Trop.* 48, 1001-13.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. The venomous Reptiles of the western Hemisphere. Cornell University Press, Ithaca, NY.

- Carranza, S., Arnold, E.N., Wade, E., Fahd, S., 2004. Phylogeography of the false smooth snakes, *Macroprotodon* (Serpentes, Colubridae): mitochondrial DNA sequences show European populations arrived recently from Northwest Africa. *Mol Phylogenet. Evol.* 33, 523-32.
- Castellano, S., Malhotra, A., Torpe, R.S., 1994. Within - island geographic variation of the dangerous Taiwanese snake, *Trimeresurus stejnegeri*, in relation to ecology. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 52, 365-375.
- Castoe, T.A., Chippindale, P.T., Campbell, J.A., Ammerman, L.K., Parkinson, C.L., 2003. Molecular systematics of the middle American jumping pitvipers (genus *Atropoides*) and phylogeography of the *Atropoides nummifer* complex. *Herpetologica* 59, 420-431.
- Castoe, T.A., Doan, T.M., Parkinson, C.L., 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of gymnophthalmid lizards. *Syst. Biol.* 53, 448-469.
- Castoe, T.A., Sasa, M.M., Parkinson, C.L., 2005. Modeling nucleotide evolution at the mesoscale: The phylogeny of the Neotropical pitvipers of the *Porthidium* group (Viperidae: Crotalinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 881-898.
- Castoe, T.A., Parkinson, C.L., 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 91-110.

- Castoe, T.A., Spencer, C.L., Parkinson, C.L., 2007. Phylogeographic structure and historical demography of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): A perspective on North American desert biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42 , 193-212.
- Cavers ,S., Navarro, C., Lowe, A.J., 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Mol. Ecol.* 12, 1451–1460.
- Cerdas, L., Lomonte, B., 1982. The snake eating capacity and the resistance to snake venoms of the Zopilota (*Clelia clelia*) of Costa Rica. *Toxicon* 20, 936–939.
- Cheviron, Z.A., Hackett , S.J., Capparella, A.P., 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 338–357.
- Chui, Y.W., Chen, H.C., Lee, S.C., Chen, C.A. 2002. Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail *Chipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda) in Taiwan. *Zool. Stud.* 41, 321-331.
- Cisneros-Heredia, D.F., Touzet, J.M., 2004. Distribution and conservation status of *Bothrops asper* (GARMAN, 1884) in Ecuador (Squamata: Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Herpetozoa*, 17, 135 – 141.

- Clarke K. R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117-143.
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd ed. PRIMER-E, Plymouth, United Kingdom.
- Coates, A.G., Jackson, J.B.C., Collins, L.S., Cronin, T.M., Bybekk, L. M., Jung, P., Obando, J.A., 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western of Panama. *Geol. Soc. Am. Bull.* 104, 814-828.
- Coates, A.G., Obando, J.A., 1996. The geological evolution of the Central American Isthmus. In: Jackson J.B.C., Budd. A.F., Coates, A.G. (Eds.), *Evolution and Environment in Tropical América*. University of Chicago Press, Chicago. IL, pp. 21-56.
- Collins, L. S., Coates, A. G., Bergreen, W.A., Aubry, M.P., Zangh, J. 1996. The Late Miocene Panama Isthmus Strait. *Geology* 24 , 687-690.
- Coney, P.J., 1982. Plate tectonic constraints on the biogeography of Middle America and the Caribbean region. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 69, 432-443.

- Cope, E.D., 1876. (dated 1875). On the Batrachia and Reptilia of Costa Rica. J. Acad. Nat. Sci. Phila 8, 93-157.
- Cope, E.D., 1887. Catalogue of batrachian and reptiles of Central America and Mexico. Bull. Natl. US Mus 32, 1-98.
- Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. In Johnston R. (Ed.), Current Ornithology, Plenum Press, New York, pp. 159-187.
- Crawford, A.J., Bermingham, E., Polanía, C., 2007. The role of tropical dry forest as a long-term barrier to dispersal: a comparative phylogeographic analysis of dry forest tolerant and intolerant frogs. Mol. Ecol. 16, 4789-4807.
- Cropp, S., Boinski, S., 2000. The Central American squirrel monkey (*Saimiri oesterdii*): introduced hybrid or endemic species?. Mol. Phylogenet. Evol. 16, 350-365.
- Cutler, D. J. 2000. Estimating divergence times in the presence of an overdispersed molecular clock. Mol. Biol. Evol. 17, 1647-1660.
- De Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard, D. J., Berlocher, S. H. (Eds.), Endless Forms: Species and Speciation, Oxford University Press, New York. pp. 57-75.

- Demastes J,W., Hafner, M.S., Hafner, D.J., 1996. Phylogeographic variation in two Central American pocket gophers (*Orthogeomys*). J. Mammal. 77, 917-927.
- Dinerstein, E., Olson, D., Graham, D., Webster, A., Primm, S., Bookbinder, M., Ledec, G.,1995. Una evaluación del estado de conservación de las ecorregiones terrestre de América Latina y El Caribe. WWF - Banco Mundial. Washington, D.C.
- Dong, S., Kumazawa, Y., 2005. Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: Phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. J Mol Evol. 61, 12-22.
- Douglas, M.E., Douglas, M.R., Schuett, G.W., Porras, L.W., 2006. Evolution of rattlesnakes (Viperidae; *Crotalus*) in the warm deserts of western North America shaped by Neogene vicariance and Quaternary climate change. Mol. Ecol. 15, 3353-3374.
- Dowling, H.G., 1951. A proposed standard system of counting ventrals in snakes. Br J. Herpetol. 1, 97-99.
- Duellman, W.E., 1999. Distribution patterns of amphibians in South America. Patterns of distribution of amphibians: a global perspective, Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD., pp. 255-328.

- Eberhard, J.R., Bermingham, E., 2004. Phylogeny and Biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. *The Auk* 121, 318-332.
- Efron, B., Halloran E., Holmes, S., 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 085-7090.
- Estes, R., Baez, A., 1985. Herpetofaunas of North and South America during the late Cretaceous and Cenozoic: evidence for interchange? In: Stehli, F.G., Webb, S.D. (Eds.), *The Great American Biotic Interchange*. New York: Plenum Press, 139-197.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1995. Testing significance of Incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Felsenstein, J., 1984. Distance methods for inferring phylogenies: A justification. *Evolution* 38, 16-24.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Ferrusquia-Villafranca, I., 1978. Distribution of Cenozoic Vertebrate Faunas in Middle and North and South America, pp. 193-321. Instituto de Geología y Biología, Universidad Autónoma de México, México DF.

- Fjelds , J., 1994. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodivers. Conserv.* 3, 207-226.
- Flores-Villela, O., Pérez-Higareda, G., Vogt, R.C., Palma-Muñoz, M., 1987. Claves para los Géneros y Especies de Anfibios de la Región de los Tuxtlas. Universidad Autónoma Nacional de México, México, 27. pp.
- Fontanella, F.M., Feldman, C.R., Siddall, M.E., Burbrink, F.T., 2008. Phylogeography of *Diadophis punctatus*: extensive lineage diversity and repeated patterns of historical demography in a trans-continental snake. *Mol Phylogenet Evol.* 46, 1049-1070.
- Fox, W., 1948. Effect of temperature on development of scutellation in the gartersnake, *Thamnophis e. atratus*. *Copeia* 4, 252-262.
- Freire-Lascano, L.A., Kuch, U., 1994. A note on the geographical distribution of *Bothrops asper* (Garman, 1883) in Ecuador. *Snake* 26, 135-139.
- Gans, C., 1964. A redescription of, and geographic variation in, *Liophis miliaris* Linné, the common water snake of southeastern South America. *Am. Mus. Novit.* 2178, 1-58.

- García-París, M., Good, D.A., Parra-Olea, G., Wake, D.B., 2000. Biodiversity of Costa Rican salamanders: implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1640-1647.
- Garman, S., 1884. The reptiles and batrachians of North America. *Mem. Mus. Comp. Zool.* 8, 1-185.
- Gaulke, M., Roesler, H., Brown, R.M., 2007. A New Species of *Luperosaurus* (Squamata: Gekkonidae) from Panay Island, Philippines, with Comments on the Taxonomic Status of *Luperosaurus Cumingii* (Gray, 1845). *Copeia* 2, 413-425.
- Gentry, A.H., 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 69, 557-593.
- Giraud, A.R., Arzamendia, V., Cacciali, P., 2006. Geographic variation and taxonomic status of the southernmost populations of *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae). *Herpetol. J.* 16, 213-220.
- Gnanadesikan, R., 1997. Methods for statistical analysis of multivariate observations. Wiley, New York.

- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., Bonatto, S.L., 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* 15, 3969-3982.
- Greene, H.W., Campbell, J.A., 1992. The future of pitvipers. In: Campbell, J.A., Brodie, E.D. (Eds.), *Biology of the Pitvipers*. Selva, Tyler, TX, pp. 421-427.
- Gregory-Wodzicki, K.M., 2000. Uplift history of the central and northern Andes a review. *Geol. Soc. Am. Bull.* 112, 1091-1105.
- Gutberlet Jr., R. L., Harvey, M. B., 2004. The evolution of New World venomous snakes. In: Campbell, J. A., Lamar, W.W. (Eds.), *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 634-682.
- Gutiérrez, J. M., Chaves, F., Bolaños, R., 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 1980, 28, 341-351.
- Gutiérrez, J.M., 1995. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 645-665.

- Gutberlet Jr., R. L., Harvey, M. B., 2004. The evolution of New World venomous snakes. In: Campbell, J. A., Lamar, W.W. (Eds.), *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 634-682.
- Haffer, J., 1967. Speciation in Colombian forest birds west of the Andes. *Am. Mus. Novit.* 294, 1-57.
- Hairston, N.G. Jr., Ellner, S.P., Geber, M.A., Yoshida, T., Fox, J.A., 2005. Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecol. Lett.* 8, 1114-1127.
- Halas, D., Zamparo, D., Brooks, D.R., 2005. A historical biogeographical protocol for studying biotic diversification by taxon pulses. *J. Biogeogr.* 32, 249-260.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hanken, J., Wake, D.B., 1982. Genetic differentiation among plethodontid salamanders (genus *Bolitoglossa*) in Central and South America: implications for the South American invasion. *Herpetologica* 38, 272-287.

- Harris, D., Rogers, D.S., Sullivan, J., 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology*, 9, 2129–2135.
- Hasbún, C. R., Gómez, A., Köhler, G., Lunt, D.H., 2005. Mitochondrial DNA phylogeography of the Mesoamerican spiny-tailed lizards (*Ctenosaura quinquecarinata* complex): historical biogeography, species status and conservation. *Mol. Ecol.* 14, 3095–3107.
- Haq, B.U., Hardenbol, J., Vail, P.R., 1987. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science*, 235, 1156–1167.
- Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42, 182–192.
- Hirth, H.F., 1964. Observations of the fer-de-lance *Bothrops atrox* in coastal Costa Rica. *Copeia* 1964, 453–454.
- Holman, J.A., 2000. Fossil snakes of North America. Origin, Evolution, Distribution, Paleocology. Indiana University Press, Indianapolis.
- Hoffmann, F.G., Baker, R.J., 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae). *Mol. Ecol.* 12, 3403–3414.
- Hoge, A.R., 1966. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). *Mem. Inst. Butantan* 32, 109–184.

- Horton, D.R., 1972. Lizard scale size and adaptation. *Syst. Zool.* 21, 441-443.
- Hoyos M.A., Otero R., Saldarriaga M., Jaramillo N., 2003. Divergencia morfológica entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (Serpientes: Viperidae). *Actualidades Biológicas* 25, 157-165.
- Huang, S., He, S., Peng, Z., Zhao, K., Zhao E., 2007. Molecular phylogeography of endangered sharp-snouted pitviper (*Deinagkistrodon acutus*; Reptilia, Viperidae) in Mainland China. *Mol Phylogenet Evol.* 44, 942-952.
- Huelsenbeck, J.P., Crandall, K.A., 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 437-466.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.R., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Hughes, L., 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol. Evol.* 15, 56-61.
- Hughes, C., Eastwood, R., 2006. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10334-10339.
- Hulme, M., Sheard, N., 1999. Escenarios de Cambio Climático para Mesoamerica, Unidad de Investigación Climática, Norwich, Reino Unido, 6pp.

- Iturralde-Vinent, M.A., 2006. Meso-Cenozoic Caribbean paleogeography: implications for the historical biogeography of the region. *Int. Geol. Rev.* 48, 791–827.
- Janzen, F.J., Krenz, J.G., Haselkorn, T.S., Brodie, E.D., Brodie, E.D., 2002. Molecular phylogeography of common garter snakes (*Thamnophis sirtalis*) in western North America: implications for regional historical forces. *Mol Ecol.* 11, 1739-1751.
- Jiménez-Pórras, J.M., 1964. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox* from Costa Rica. *Toxicon* 2, 155–166.
- Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. In: Roberts, DB. (Ed.), *Drosophila: a Practical Approach.*, IRL Press, Oxford, pp 275-286.
- Jobb, G. TREEFINDER version of June 2008. 2008. Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de.
- Kark, S., Warburg, I., Werner, Y.L., 2003. Polymorphism in the snake *Psammophis schokarion* both sides of the desert edge in Israel and Sinai. *J. Arid Environ.* 37, 513-527.
- Kattan, G.H., Padu, F., Rojas, V., Morales, G., 2004. Biological diversification in a complex region: a spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *J. Biogeogr.* 31, 1829–1839.

- Kinnison, M.T., Hendry, A.P., 2001. The pace of modern life II: from rates of contemporary microevolution to pattern and process. *Genetica*, 112-113, 145-164.
- King, R.B., 1997. Variation in Brown Snake (*Storeria dekayi*) Morphology and Scalation: Sex, Family, and Microgeographic Differences. *J. Herpetol.* 31, 335-346.
- Kishino, H., Thorne, J.L., Bruno, W.J., 2001. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18, 352-361.
- Kuch, U., Keogh, J.S., Weigel, J., Smith, L.A., Mebs, D., 2005. Phylogeography of Australia's king brown snake (*Pseudechis australis*) reveals Pliocene divergence and Pleistocene dispersal of a top predator. *Naturwissenschaften*. 92, 121-7.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5, 150-163.
- Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, M. & Ozawa, T. 1998 The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics* 150, 313-329

- Lamar, W.W., Sasa, M., 2003. A new species of hognose pitviper, genus *Porthidium*, from the southwestern Pacific of Costa Rica (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* 51, 797-804.
- Lawson, R., Slowinski, J.B., Crother, B.I., Burbrink, F.T., 2005. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol.* 37, 581-601.
- Lee, J.C., 1996. *The Amphibians and Reptiles of the Yucatan Peninsula*. Cornell University Press, Ithaca, NY, 500 pp.
- Lessa, E.P., 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Syst. Zool.* 39, 242-252.
- Linder, H.P., Hardy, C.R., Rutschmann, F., 2005. Taxon sampling effects in molecular clock dating: an example from the African Restionaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35, 569-582.
- Lomonte, B., Carmona, E., 1992. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* B. 102, 325-329.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Guillon, M., Naulleau, G., 2004. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos* 104, 551-560.

- Lukoschek, V., Waycott, M., Marsh, H., 2007. Phylogeography of the olive sea snake, *Aipysurus laevis* (Hydrophiinae) indicates Pleistocene range expansion around northern Australia but low contemporary gene flow. *Mol Ecol.* 16, 3406-3422.
- Magallón, S. A., 2004. Dating lineages: Molecular and paleontological approaches to the temporal framework of clades. *Int. J. Plant Sci.* 165, 7-21.
- Mann, P., Rogers, R., Gahagan, L., 2006. Overview of plate tectonic history and its unresolved tectonic problems. *Central America: Geology, Resources, and Hazards.* (ed. by J. Bundschuh), pp. 205-241. Balkema Publisher.
- Malhotra, A., Thorpe, R.S., 1997. Microgeographic variation in scalation of *Anolis oculatus* (Dominica, West Indies): a multivariate analysis. *Herpetologica* 53, 49-62.
- Malhotra, A., Thorpe, R.S., 2000. A phylogeny of the *Trimeresurus* group of pit vipers: new evidence from a mitochondrial gene tree. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 199-211.
- Maltagliati, F., Camilli, L., Lardicci, C., Castelli, A., 2001. Evidence for morphological and genetic divergence in *Perinereis cultrifera* (Polychaeta: Nereididae) from two habitat types at Elba Island. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 81, 411-414.

- Markezich, A.L., Taphorn, D.C., 1993. A variational analysis of populations of *Bothrops* (Serpentes: Viperidae) from Western Venezuela. *J. Herpetol.* 27, 248-254.
- Marshall, L.G., Webb, S.D., Sepkoski, J.J., Raup, D.M., 1982. Mammalian evolution and the Great American Interchange. *Science.* 215, 1351-1357.
- Marshall, L.G., Sempere, T., 1993. Evolution of the Neotropical Cenozoic land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic, and tectonic context. In: Goldblatt, P. (Eds.), *Biological relationships between Africa and South America*, Yale University Press, New Haven, CT, pp. 329-392.
- Marshall, C.J., Liebherr, J.K., 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *J. Biogeogr.* 27, 203-216.
- Marshall, J.S., 2006. The geomorphology and physiographic provinces of Central America. In: Bundschuh, J., Alvarado, G. (Eds.), *Central America: Geology, Resources, and Hazards*. Taylor and Francis, pp. 75-122.
- Martins, M., Araujo, M.S., Sawaya, R.J., Nunes, R., 2001. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *J. Zool. (Lond.)* 254, 529-538.
- Matthee, C.A., Burzla, V, J.D., Taylor, J.F., Davis, S.K., 2001. Mining the mammalian genome for artiodactyl systematics. *Syst. Biol.* 50, 367-390.

- Matthee, C.A., Davis, S.K., 2001. Molecular insights into the evolution of the family Bovidae: a nuclear DNA perspective. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1220–1230.
- Matthee, C.A., Jansen van Vuuren, B., Bell, D., Robinson, T.J., 2004. A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identifications of five intercontinental exchanges during the Miocene. *Syst. Biol.* 53, 433–447.
- McCarty, J.P., 2001. Ecological consequences of recent climate change. *Conserv. Biol.* 15, 320–331.
- McDiarmid, R.W., Campbell, J.A., Touré, T.S.A., 1999. Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, Vol. 1. Herpetologists League, Washington, DC.
- Millien, V., Lyons S. K., Olson, L., Smith, F. A., Wilson, A.B., Yom-Tov, Y., 2006. Ecotypic variation in the context of global climate change: revisiting the rules. *Ecology Letters* 9, 853–869.
- Moreno-Arias, R.A., Medina-Rangel, G.F., Castaño-Mora, O.V., 2008. Lowland reptiles of Yacopí (Cundinamarca, Colombia). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 32, 93–103.

- Moritz, C., Schneider, C. J., Wake, D. B., 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Syst. Biol.* 41:273–291.
- Morrone, J. J., 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe. Manuales & Tesis SEA, nro. 3, Sociedad Entomológica, Aragonesa, Zaragoza (España), pp. 55-56.
- Mulcahy, D.G., Archibald, M.A., 2003. Geographic Variation in the Baja California Nightsnake (*Eridiphas slevini*), with Comments on Taxonomy and Diet. *J. Herpetol.* 37, 566-571.
- Mulcahy, D.G., 2008. Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (*Hypsiglena torquata*): Revisiting the subspecies concept. *Mol Phylogenet Evol.* 46, 1095-115.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., 1997. GenDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. www.Psc.edu/biomed.GenDoc.
- Noonan, B.P., Chippindale, P.T., 2006. Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 347–358.

- Noonan, B., Wray, K. P., 2006. Neotropical diversification: the effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. *J. Biogeography* 33, 1007-1020.
- Nores, M., 2004. The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global. Ecol. Biogeogr*, 13, 149-161.
- Novick, R.R., Dick, C.W., Lemes, M.R., Navarro, C., Caccone, A., Bermingham, E., . 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 12, 2885-2893.
- Nylander, J. A. A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Osgood, D.W., 1978. Effects of temperature on the development of meristic characters in *Natrix fasciata*. *Copeia* 1978, 33-46.
- Otero, R., Osorio, R.G., Valderrama, R., Giraldo, C.A., 1992. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). *Toxicon* 30, 611-620.

- Otero, R., Gutiérrez, J.M., Núñez, V., Robles, A., Estrada, R., Segura, E., Toro, M.F., García, M.E., Díaz, A., Ramírez, E.C., Gómez, G., Castañeda, J., Moreno, M.E., Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER), 1996. A randomised double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 696–700.
- Parra-Olea, G., García-París, M., Wake, D.B., 2004. Molecular diversification of salamanders of the tropical American genus *Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae) and its evolutionary and biogeographical implications. *Biol. J. Linn. Soc. Lond* 81, 325–346.
- Parkinson, C.L., 1999. Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia*, 1999, 576–586.
- Parkinson, C.L., Zamudio, K.R., Greene, H.W., 2000. Phylogeography of the pitviper clade *Agkistrodon*: historical ecology, species status, and conservation of cantils. *Mol. Ecol.* 9, 411–420.
- Parkinson, C.L., Campbell, J.A., Chippindale, P.T., 2002a. Multigene phylogenetic analyses of pitvipers; with comments on their biogeography. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Green, H.W. (Eds.), *Eagle Mountain Publishing*, Salt Lake City, Utah, U.S.A, pp 93–110.

- Parkinson, C.L., Zamudio, K.R., Greene, H.W., 2002b. Phylogeography of the pitviper clade *Agkistrodon*: historical ecology, species status, and conservation of cantils. *Mol. Ecol.* 9, 411-420.
- Parnesan, C., Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37-42.
- Parmley, D., Holman, J., 2007. Earliest fossil record of a Pigmy rattlesnake (*Viperidae: Sistrurus* Garman). *J. Herpetol.* 41, 141-144.
- Perez-Eman, J.L., 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical redstarts (*Myioborus*; Aves, *Parulinae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 511-528.
- Peters, J.A., Orejas-Miranda, 1970. Catalogue of the neotropical Squamata: Part I: Snakes. *Bull. U.S. Nat. Mus.* 297, 1-347.
- Picado, T.C., 1931. *Serpientes Venenosas de Costa Rica*. Imprenta Alsina, Sauter. Arias & Co., San José, Costa Rica.
- 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 269-282.

- Potts, R., Behrensmeyer, A.K., 1992. Late Cainozoic terrestrial ecosystems. In: Behrensmeyer, A.K., Damuth, J.D., DiMichele, W.A., Potts, R., Sues, H.D., Wing, S.L. (Eds), *Terrestrial Ecosystems Through Time: Evolutionary Paleoecology of Terrestrial Plants and Animals*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 419-541.
- Puerto, G., Salomão, M.G., Theakston, R.D.G., Thorpe, R.S., Warrell, D.A., Wüster, W., 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *J. Evol. Biol.* 14, 527-538.
- Ramírez-Ávila, J., Quevedo, B.E., López, E., Renjifo J.M., 2004. Purification and partial characterization of phospholipases A2 from *Bothrops asper* (Barba amarilla) snake venom from Chiriguana (Cesar, Colombia). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 10, 242-259.
- Renner, S. S., 2005. Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends. Plant Sci.* 10, 550-558.
- Rogers, A.R., Harpending, H.C., 1992. Populations growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.

- Ron, S., 2008. Biogeographic area relationships of lowland Neotropical rainforest based on raw distributions of vertebrate groups. *Biol. J. Linn. Soc.* 71, 379-402.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schnelder, S.H., Rosenzweig, C., Pounds, J.A., 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421, 57-60.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Rutschmann F., 2004. Bayesian molecular dating using PAML/multidivtime. A step-by-step manual. University of Zurich , Switzerland. Available from : <
<http://www.plant.ch>>.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405-411.

- Salomão, M. da G., Wüster, W., Thorpe, R.S., BBBSP., 1997. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops*. pp. 89-98. In: Thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotre, A., (Eds.). *Venomous snake: Ecology, Evolution and snakebite*. Symp. Zool.Soc.London. 70, Clarendon Press, Oxford.
- Sanders, K.L., Lee, M.S., Leys, R., Foster, R., Keogh, J.S., 2008. Molecular phylogeny and divergence dates for Australasian elapids and sea snakes (hydrophiinae): evidence from seven genes for rapid evolutionary radiations. *J Evol Biol.* 21, 682-95.
- Sanders, K. L., Malhotra, A., Thorpe, R.S., 2004. Ecological diversification in a group of Indomalayan pitvipers (*Trimeresurus*): convergence in taxonomically important traits has implications for species identification. *J. Evol. Biol.* 17, 721-731.
- Sanders, K.L., Lee, M.S., 2007. Molecular evidence for a rapid late-Miocene radiation of Australasian venomous snakes (Elapidae, Colubroidea). *Mol Phylogenet Evol.* 46, 1165-73.
- Sanderson, M. J., Thorne, J. L., Wikström, N., Bremer, K., 2004. Molecular evidence on plant divergence times. *Am. J. Bot.* 91, 1656-1665.

- Santos, X., Pleguezuelos, J. M., 2003. Variación morfológica en la culebra lisa meridional *Coronella girondica* (Daudin, 1803) a través de su área de distribución. Rev. Esp. Herpetol. 17, 55-73.
- Sasa, M., Barrantes, R., 1998. Allozyme variation in populations of *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. Herpetologica 54, 462-469.
- Sasa, M., 2002. Morphological variation in the lancehead pitviper *Bothrops asper* (Garman) (Serpentes: Viperidae) from Middle America. Rev. Biol. Trop. 50, 259-271.
- Sasa, M., Wasko, D.K., Lamar, W W., 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica, Toxicon (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.024.
- Savage, J. M., 1982. The enigma of the Central American herpetofauna: dispersals or vicariance. Ann. Mo. Bot. Gard. 69, 464-547.
- Savage, J.M., 1987. Systematics and distribution of the Mexican and Central American rainfrogs of the *Eleutherodactylus gollmeri* group (Amphibia: Leptodactylidae). Fieldiana Zoology, 33, 1-57.
- Savage, J. M., 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between two continents , between Two Seas. University of Chicago, Press, Chicago, IL.

- Schätti, B., Kramer, E., 1991. A new pitviper from Ecuador, *Bothriechis mahnerti*. n.sp. Rev. Suisse of Zoology 98, 9-14.
- Smith, H.M., Taylor, E.H., 1945. An annotated checklist and key to the snakes of Mexico. Bull. US Natl. Mus 187, 1-239.
- Smith, F.A., Betancourt, J.L., 1998. Response of bushy-tailed woodrats (*Neotoma cinerea*) to late quaternary climatic change in the Colorado Plateau. Q. Res. 50, 1-11.
- Solano, J., Villalobos, R., 2001. Aspectos Fisiográficos aplicados a un Bosquejo de Regionalización Geográfico Climático de Costa Rica. Top. Meteor. Oceanog. 8, 26-39.
- Solórzano, A., 2004. Serpientes de Costa Rica: Distribución, Taxonomía e Historia Natural/Snakes of Costa Rica: Distribution, Taxonomy, and Natural History. Editorial INBio, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica.
- Soulé, M., Kerfoot, W.C., 1972. On the climatic determination of scale size in a lizard. Syst.Zool. 21, 97-105.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

- Taylor, E.H., 1954. Further studies on the serpents of Costa Rica. Univ. Kansas Sci. Bull. 36, 673-801.
- Taylor, H.L., Cooley, C.R., 1995. A multivariate analysis of morphological variation among parthenogenetic teiid lizards of the *Cnemidophorus cozumela* complex. Herpetologica. 51, 67-76.
- Thorne, J.L., Kishino, H., Painter, I.S., 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. Mol. Biol. Evol. 15, 1647-1657.
- Thorne, J.L., Kishino, H., 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. Syst. Biol. 51, 689-702.
- Thorpe, R.S., 1976. Biometrics analysis of geographic variation and racial affinities. Biol. Rev. 51, 407-452.
- Thorpe, R.S., 1991. Clines and cause: microgeographic variation in the Tenerife gecko (*Tarentola delalandii*). Syst. Zool. 40, 172-187.
- Thorpe, R.S., McCarthy, C.J., 1978. A preliminary study, using multivariate analysis, of a species complex of African house snakes (*Boaedon fuliginosus*). J. Zool. (Lond.). 184, 484-506.
- Thorpe, R.S., Baez, M., 1987. Geographic variation within an island: univariate and multivariate contouring of scalation, size and shape of the lizard *Gallotia galloti*. Evolution 41, 256-268.

- Triant, D. A., Dewoody, J. A., 2007. The occurrence, detection, and avoidance of mitochondrial DNA translocations in mammalian systematics and phylogeography. *J. Mammal.* 88, 908-920.
- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelström, H., Fumagalli, L., 2006. Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Mol Ecol.* 15, 3425-3437.
- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L., Mayer, W., 2008. Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 1116-1128.
- Vanzolini, P.E., Heyer, W.R., 1985. The American herpetofauna and the interchange. In: Sthli, F.G., Webb, S.D. (Eds), *The Great American Biotic Interchange*. Plenum Press, New York, NY, pp.475-487.
- Vargas, G., 2004. La escala zonal, regional y local en el análisis del régimen pluviométrico del Istmo Centroamericano. *Rev. Reflexiones* 83, 31-56.
- Venegas, P.J., Siu-Ting, K., Jordán, J.C., 2008. Notes on geographic distribution. *Amphibia, Hylidae, Hypsiboas pellucens*: First country record, Peru. *Check List* 4, 214-217.

- Vidal, N., Hedges, S.B., 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C R Biol.* 328, 1000-1008.
- Villa, J., Wilson, L.D., Johnson., 1988. Middle American herpetology: A bibliographic checklist. Univ. Missouri, Columbia, Missouri.
- Wang, I.J., Crawford, A.J., Bermingham, E., 2008. Phylogeography of the Pigmy Rain Frog (*Pristimantis ridens*) across the lowland wet forest of Isthmian Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 992-1004.
- Webb, S.D., Rancey, A., 1996. Late Cenozoic evolution of the Neotropical mammal fauna. In: Jackson, J.B.C., Budd, A.F, Coates, A.G. (Eds.), *Evolution and Environmental in Tropical America*. University of Chicago Press, Chicago, pp.335-358.
- Wake, D. B., Schneider, C. J., 1998. Taxonomy of the plethodontid salamander genus *Ensatina*. *Herpetologica* 54:279–298.
- Weigt, L.A., Crawford, A.J., Rand, A.S., Ryan, M.J., 2005. Biogeography of the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*: a molecular perspective. *Mol. Ecol.* 14, 3857–3876.
- Welch, J. J., Bromham, L., 2005. Molecular dating when rates vary. *Trends Ecol. Evol.* 20, 320–327.

- Werman, S.D., 1992. Phylogenetic relationship of Central and South American Pitvipers of the genus *Bothrops* (Sensu lato). Cladistic analysis of biochemical and anatomical characters. In: Campbell J.A., Brodie Jr, E.D. (Eds). Biology of the Pitvipers. Selva Tyler, Texas. pp. 21-40.
- Whitmore, T.C., Prance, G.T., 1987. Biogeography and Quaternary History in Tropical America. Oxford Monographs on Biogeography No. 3. Oxford: Clarendon Press.
- Wilson, L.D., Meyer, J.R., 1985. The snakes of Honduras. Milwaukee Publ. Biol. Geol 6, 1-159.
- Willows-Munro, S., Robinson, T.J., Matthee, C.A., 2005. Utility of nuclear DNA intron markers at lower taxonomic levels: Phylogenetic resolution among nine *Tragelaphus* spp. Mol. Phylogenet. Evol. 35, 624-636.
- Winer, B.J., Brown, D.R., Mitchels, K.M., 1991. Statistical principles in experimental design. McGraw-Hill. New York.
- Wood, D.A., Fisher, R.N., Reeder, T.W., 2008. Novel patterns of historical isolation, dispersal, and secondary contact across Baja California in the Rosy Boa (*Lichanura trivirgata*). Mol Phylogenet Evol. 46, 484-502.

- Wüster, W., Thorpe R.S., Puerto, G., BBBSP., 1996. Systematics of the *Bothrops atrox* complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brazil: A multivariate analysis. *Herpetologica* 52, 263-271.
- Wüster, W., Salomão, M.G Thorpe R.S., Puerto, G., Furtado, M. F. D., Hoge S. A., Theakston, R.D.G., Warrell, D. A., 1997. Systematics of the *Bothrops atrox* species complex: insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In Thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotra, A. (Eds.), *Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite*. Clarendon Press, Oxford. *Symposia of the Zoological Society of London*, No. 70, Pp. 99-113.
- Wüster, W., Salomão, M.da G., Duckett, G.J., Thorpe, R.S., BBBSP., 1999. Mitochondrial DNA Phylogeny of the *Bothrops atrox* species Complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia* 8, 135-144.
- Wüster, W., da Graca Salomão, M., Quijada-Mascareñas, J.A., Thorpe, R.S., Butantan-British Bothrops Systematics Project, 2002a. Origin and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence data. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Salt Lake City, UT, pp. 111-128.

- Wüster, W., Thorpe, R.S., Salomão, M.G., Thomas, L., Puerto, G., Theakston, R.D.G., Warrel, D.A., 2002b. Origin and phylogenetic position of the Lesser Antillean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. *Bull. Nat. Hist. Mus. Zool.* 68, 101-106.
- Wüster, W., Ferguson, J.E., Quijada-Mascareñas, J. A., Pook, C. E., Salomão, M. G., Thorpe, R.S., 2005a. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol. Ecol.* 14, 1095-1108.
- Wüster, W., Duarte, M.R., Salomao, M d.G., 2005b. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. *J. Zool. (Lond.)* 266, 1-10.
- Wüster, W., Crookes, S., Ineich, I., Mané, Y., Pook, C.E., Trape, J-F, Broadley, D.G., 2007. The phylogeny of cobras inferred from mitochondrial DNA sequences: Evolution of venom spitting and the phylogeography of the African spitting cobras (Serpentes: Elapidae: *Naja nigricollis* complex). *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 437-453
- Xia, X., Xie. Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371-373.

- Yan, J., Li, H., Zhou, K., 2008. Evolution of the mitochondrial genome in snakes: Gene rearrangements and phylogenetic relationships. *BMC Genomics* 9, 569–576.
- Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *CABIOS* 13, 555–556. Available from: <<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>>.
- Yoder, A.D., Yang, Z., 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1081-1090.
- Yom-Tov, Y., 2001. Global warming and body mass decline in Israeli passerine birds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268, 947-952.
- Yom-Tov, Y., Yom-Tov, S., Wright, J., Thorne, C.J.R., Du-Feu, R., 2006. Recent changes in body weight and wing length among some British passerine birds. *Oikos*, 112, 91-101.
- Zamudio, K.R., Greene, H.W., 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for Neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biol. J. Linn. Soc.* 62, 421–442.
- Zhang, De-X., Godfrey, M. H., 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11, 247-251

- Zuckerlandl, E., Pauling, L., 1965. Evolutionary divergence and convergence. in proteins. In: Bryson, V., Vogel, H.J. (Eds.), *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York. pp. 97-166.
- Zwiers, F.W., Zhang, X., 2003. Toward Regional-Scale Climate Change Detection. *J Clim* 16, 793-797.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* i(Garman, 1884; Serpentes: Viperidae)

Mónica María Saldarriaga-Córdoba^{a,b}, Mahmood Sasa^{c,*}, Rodrigo Pardo^d,
Marco Antonio Méndez^a

^a Laboratorio de Genómica Evolutiva, INTA, Universidad de Chile, Macul 5540, Macul Santiago, Chile

^b Programa de Ofidismo/Escurpionismo, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^c Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

^d Centro de Ecología Aplicada, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form 20 May 2009

Accepted 20 May 2009

Available online xxx

Keywords:

Neotropical region
Scutellation
Geographic variation
Pitviper
Mantel test
Ecogenetics

ABSTRACT

The terciopelo *Bothrops asper*, is a cryptic lancehead pitviper widely distributed in humid environments of Middle America and the north-western portion of South America. Throughout its extensive distribution range, the terciopelo exhibits great morphological variation in external characters, a situation that has complicated its proper separation from other related species. In this paper, we analyzed the phenotypic variation of *B. asper* based in a sample of 514 specimens from nine distinct physiographic regions. Univariate and multivariate analyses demonstrated great phenotypic differentiation among most pre-established groups, and the pattern is fairly congruent between sexes. However, no correspondence was observed between morphological variation and molecular divergence, inferred from mtDNA sequences, between individuals representing the physiographical regions under study. Geographic variation in the number of interrials, ventral scales, subcaudal scales and dorsal blotches was positively correlated with latitude and number of dry months, but inversely related with precipitation. However, other variables do not exhibit such an effect. The observed relationships between scale counts and environmental variables are explained in terms of selective pressures to improve water balance along the distributional range of the species.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Measures of intraspecific variation in morphological and molecular features are fundamental in the study of evolutionary changes among populations. In squamates, most accounts of phenotypic variation are based on scutellation characteristics (Thorpe, 1991; King, 1997; Puerto et al., 2001; Santos and Pleguezuelos, 2003; Mulcahy and Archibald, 2003; Calsbeek et al., 2006; Mulcahy, 2008), color

patterns and pigmentation (Giraud et al., 2006; Allsteadt et al., 2006), scale shape and ornamentals (Brown et al., 1997; Gaulke et al., 2007), and the use of morphometrics (Auffenberg, 1955).

Often, external characters show high levels of polymorphism (Bittner and King, 2003; Kark et al., 2003), resulting in increased overlap among groups, even among those not so closely related. This situation frequently occurs when convergence in morphological characters results from adaptations to extrinsic ecological factors (Sanders et al., 2004).

The effects of ecogenetic and phylogenetic attributes in shaping patterns of morphological variation have been

* Corresponding author. Tel.: +506 2229 3135; fax: +506 2292 0485.
E-mail addresses: monysalda@yahoo.com.ar (M.M. Saldarriaga-Córdoba),
msasamarin@gmail.com (M. Sasa).

addressed mostly in island populations of lizards (Brown et al., 1991; Thorpe, 1991; Malhotra and Thorpe, 1997), and snakes (Castellano et al., 1994), where selective forces act rapidly to maintain phenotypic plasticity. For instance, in pit vipers of the *Trimeresurus sumatranus* complex, selection to control cutaneous water loss could explain correlations between environmental variables and scale numbers (Sanders et al., 2004). Therefore, differences in number of scales among populations might be determined by environmental factors and not by their phylogenetic relationships.

Analyses of phenotypic differentiation often involve multivariate statistics (Wüster et al., 1997; Puerto et al., 2001) that evaluate variables as they are incorporated into a model, and improve our ability to distinguish among groups with extensive overlap (Thorpe, 1976; Thorpe and McCarthy, 1978; Taylor and Cooley, 1995). These techniques are often coupled with correlation procedures (i.e. Mantel and Partial-Mantel Test, Thorpe, 1991), allowing assessment of potential causal factors for such differentiation (i.e. geography, geology, environment, and ontogeny) while controlling for confounding inter-correlates. In this way, hypothetical causes affecting traits used in taxonomy can be evaluated, a useful measurement in the study of taxonomically challenging species.

The present work describes the morphological variation in one such problematic species: the Central America lancehead, *Bothrops asper* (Garman, 1884). This pitviper is the only member of its genus widely distributed in humid lowlands of Middle America as well as in north-western South America (Campbell and Lamar, 2004). In this region, *B. asper* is found mainly west of the Andes in Colombia and Ecuador, although it also reaches Venezuela, Trinidad, and the north eastern extreme of Perú (Venegas et al., 2008). In Colombia, this species also inhabits the inter-Andean valleys (Moreno-Arias et al., 2008) and Departamento del Cesar, in the Caribbean (Ramírez-Avila et al., 2004), whereas in Ecuador, the range of the species west of the Andes extends to the Loja province (Freire and Kuch, 1994; Cisneros-Heredia and Touzet, 2004; Boada and Salazar, 2005).

B. asper is included in the *Bothrops atrox* group that comprises the following related species: *B. atrox*, *B. isabellae*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, and *B. moojeni* (Salomão et al., 1997). Members of this clade are superficially similar in appearance, especially in their cryptic color patterns, and show high overlap in meristic characters. Consequently, major taxonomic confusion has followed the assignment of populations into nominal species (see Campbell and Lamar, 2004).

Furthermore, extensive variance in toxin composition has been reported for *B. asper* (Jiménez-Porras, 1964; Lomonte and Carmona, 1992; Alape-Girón et al., 2008) further complicating the identification of populations attributed to this species. In Costa Rica, differences in biological effects induced by venoms from distinct geographic regions (Gutiérrez et al., 1980) are so clear that some authors (e.g. Aragón and Gubensek, 1981) have suggested that taxonomic recognition of the populations of *B. asper* isolated in the Central America Isthmus can be supported. It is not clear whether other populations within the entire

range of the species exhibit such remarkable differences in venom composition.

Using a large set of characters, Sasa (2002) presented a detailed account on the extent of morphological variation in *B. asper* from Middle America. His findings support the notion that meristic characters are extremely plastic at the intraspecific level, and that geographic, gender, and age effects should be considered in taxonomic evaluations for the species. Briefly, age does not affect scutellation, although it influences color patterns. Sexual dimorphism is evident in body size (females larger than males) and some meristic variables. Sasa (2002) also noticed the existence of two clear morphological groups in Middle America: one that includes populations located in the northern portion of the species' range (Mexico-Honduras) and the other including populations from southern Nicaragua to Panama. Within each group, scutellation is fairly homogeneous, but there are substantial differences in scale counts when the groups are compared to each other.

On the other hand, little is known about the genetic structure of populations of this species. Using metabolic allozymes as molecular markers, Sasa and Barrantes (1998) suggested that – at least in Costa Rica – a great level of gene flow occurs between populations, even between those that are isolated through topographical barriers. These findings lead these authors to conclude that either the process of population isolation is relatively recent, or that a substantial level of gene flow still occurs between populations thought to be relatively isolated in the country.

The large amount of intraspecific variability observed in sampled populations of *B. asper* deserves a more comprehensive analysis, one that includes samples from the entire range of its distribution. Furthermore, in order to understand the origin of such diversity, it is necessary to analyze the association of morphological groups with their molecular identity, and the correspondence with environmental factors that might shape them. In this study, we analyze the morphological variation in *B. asper* along most of its geographical range, and we evaluate the roles of phylogenetic history and current environmental factors to explain the observed pattern of geographic variation. In particular, our goal is to establish whether geographic variation is a consequence of current ecological conditions and selective pressures or results from phylogenetic variation within this nominal species.

2. Materials and methods

2.1. Specimens and morphological variables

We constructed a database for 514 individuals of *B. asper* (218 males and 296 females), obtained from localities along the species' distribution and preserved in several museums (see Appendix 1). In addition, we analyzed live individuals from the collections of the Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica) and the Programa de Ofidismo/ Escorpionismo (Universidad de Antioquia, Colombia). Nine relevant meristic characters of scutellation and color pattern commonly used in taxonomic work in *Bothrops* (Burger, 1971) were selected, mainly because they showed a significant gender or geographic variation in previous

analyses (Sasa, 2002). Variables included are: (1) dorsal scale rows; (2) ventral scales (Dowling, 1951); (3) subcaudal scales; (4) superlabial plates; (5) infralabial plates; (6) intertrical scales (scales in the dorsum of the head along a line through the angle of the jaw); (7) dorsal blotch number; (8) width of the post-ocular band (number of scales in the band at its widest point); and (9) snout-vent length. The number of ventral scales was counted by the method of Dowling (1951), not considering the pre-ventral scales or the anal scale. The subcaudal scales were counted by pairs of segments, from the pair immediately anterior to the terminal spine to the last pre-cloacal pair (Gans, 1964). Snout-vent length was measured from the tip of the snout to the posterior border of the anal plate with a flexible metric tape to the nearest 1 mm.

Since *B. asper* shows sexual dimorphism in many selected variables (Sasa, 2002), the meristic data was analyzed separately for males and females. The sex of preserved specimens was determined by observing the presence or absence of a hemipenis through an incision in the posterior part of the cloaca.

To assess the variation of geographically distinct populations, specimens from adjacent localities were pooled into nine distinct physiographic regions (Fig. 1). Those regions are as follows: (1) México-Nuclear Central America (MNCA), including specimens from the Caribbean coast of México, Belize, Guatemala, and Honduras. This region also includes specimens from Escuintla in south Pacific Guatemala; (2) Caribbean Isthmian Central America (CICA), which includes individuals from the Caribbean region of Costa Rica and south-eastern Nicaragua; (3) Pacific Costa Rica (PCR), including only specimens from the central and

south Pacific of Costa Rica. (4) Chiriquí (CH), including locations from the western Pacific Panamá; (5) Caribbean and Central Panamá (CCP), locations from the Caribbean and central lowlands of the country, including the Canal Zone; (6) Darien Region (DRN), grouping samples from the Darien region in eastern Panamá that includes the type locality of *B. asper* (Garman, 1984); (7) Pacific Colombia (PC), localities west of the Cordillera Occidental; (8) Magdalena Valley (MV), localities between Cordillera Central and Cordillera Oriental in Colombia; and (9) Caribbean Colombia (CC), localities in the lowlands and valleys of the Rio Cauca and Rio Magdalena.

MNCA and CICA correspond to physiographic regions separated by the Nicaraguan depression until Pliocene. PCR and CICA were separated since the late Tertiary by the development of the central mountain axis that divides the Isthmian Central America lowlands (Savage, 2002).

Several specimens from Panamá lack exact information about their origin, and we decided to follow a conservative approach in this analysis. Thus, individuals from CH were separated from those obtained at PCR, and those from CCP were separated from CICA. In either case, no obvious historical or biogeographical barrier could define these groups. These last two groups are separated from PCR and CH through the eastern portion of the Talamanca Mountain Range (Fig. 1). As Darien is often recognized as a distinct biogeographic region with close affinities to the Chocóan region (Behling et al., 1998; Morrone, 2001; Savage, 2002), samples from DRN were analyzed separately here. South American specimens were included in three separated regions (PC, MV, and CC) delimited by the mountain ranges

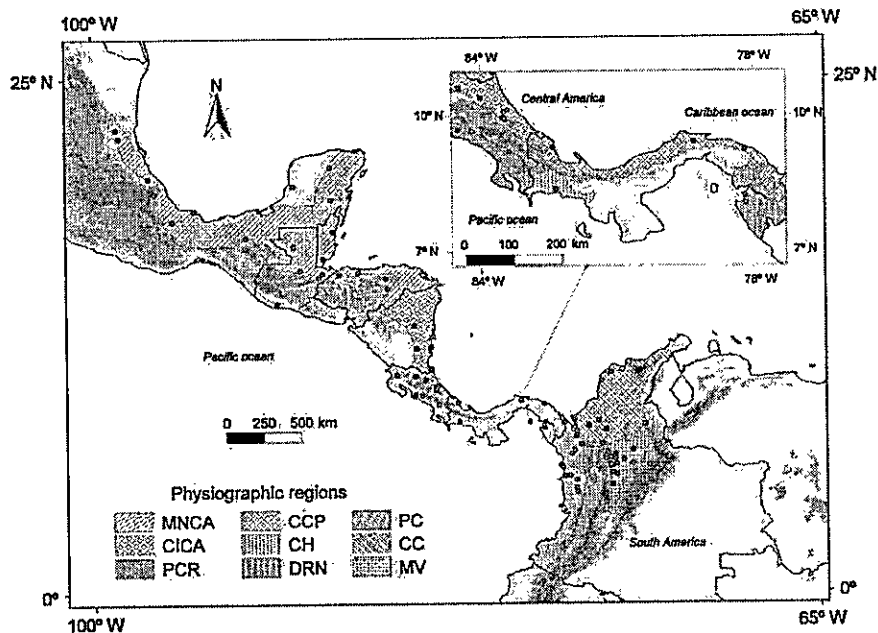


Fig. 1. Map of Middle America and northern South America showing sampling sites for *B. asper* samples used in this study. Dots represent the localities from where specimens were collected. Inset map shows CH, CCP and DRN physiographic regions in Panamá. Elevations above 1000 m are shown in gray shades.

Please cite this article in press as: Saldarraga-Córdoba, M.M. et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae), Toxicon (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

that collectively form the Northern Andes in Colombia (Kattan et al., 2004).

2.2. Molecular data

To assess molecular differences within each physiographical region, tissue samples from 12 live specimens and two sequences published in GenBank were obtained from each region, excluding Chiriqui and Central Panama (Appendix 2). Total DNA was extracted following the procedure described by Jowett (1986). Fragments from two mitochondrial genes, Cytochrome *b* (*Cyt b*) and *ND4*, were amplified according to the procedures outlined in Arévalo et al. (1994) and Parkinson et al. (2002). PCR reactions were set up in a final volume of 25 μ l (2.0 μ l genomic DNA, 0.4 μ l of each primer (10 μ M), 2.5 μ l of 10 \times PCR buffer, 0.25 μ l total dNTPs (10 mM), 1.0 μ l of MgCl₂ (50 mM), 0.2 μ l of Taq polymerase (5 U/ μ l), and 18.25 μ l H₂O). Typical amplification conditions involved initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 38 cycles of 94 °C for 40 s, 54 °C for annealing for 40 s, then 72 °C for 1 min, followed by a final extension step of 72 °C for 5 min. The amplified product was sequenced using the same primers by Macrogen (Seoul, S. Korea – <http://dna.macrogen.com>).

DNA sequences were aligned by eye with GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997). We inferred the amino acid sequences for all DNA sequences to check for the presence of premature stop codons or other nonsense mutation. Pairwise comparisons of observed proportional sequence divergence (*p*-distance) were obtained using the computer program Mega version 3.0 (Kumar et al., 2004).

Phylogenetic analysis of DNA sequences analysis was performed using Bayesian inference with the computer program MrBayes 3.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). We used as outer group *B. caribbaeus* and *B. lanceolatus*, the closest taxa to the *B. atrox-asper* complex according to Wüster et al. (2002).

To identify the most appropriate model of sequence evolution for the complete dataset (*ND4* and *Cyt b* concatenated), we used MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004), and selected the model favored under the Akaike Information Criterion in our Bayesian analysis. Four chains were run for 5 \times 10⁶ generations and sampled every 1000 generations. Nodal support was assessed by examining posterior probabilities in the Bayesian analyses. Posterior probabilities indicate percentage of the time that a given clade occurs among trees sampled in the Bayesian analyses (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

2.3. Environmental data

In our analysis, we accounted for environmental factors that we suspect to affect morphological variables. Latitude and longitude were taken as a proxy to geographic distance. Mean annual precipitation records, temperature and number of dry months per year from each sampled locality were retrieved from the climate databases of each country (Appendix 3). According to Bagnouls and Gaussen (1957) a month is considered “dry” when the average total rainfall (*P*), in mm, is less than twice the mean temperature (*T*), in °C ($P \leq 2T$).

2.4. Statistical analysis

Because the meristic characters used in this study violate the assumptions of normality (Gnanadesikan, 1997) and heteroscedasticity (Winer et al., 1991), we used non-parametric techniques to assess morphological variation. For each sex separately, morphological variables were standardized (Clarke, 1993), and the Euclidean distances among the nine physiographic regions were estimated from them. Non-metric Multidimensional Scaling (MDS) was conducted to visualize the pattern of segregation among sampled regions. This is a robust ordination method that allows reducing variables without a priori transformations, so individuals can be represented in two-dimensional plots (Lessa, 1990). MDS has been successfully applied in other morphological studies aimed to estimate nonlinear monotonic relationships (Maltagliati et al., 2001; Chui et al., 2002).

We conducted analysis of similarity (ANOSIM, Clarke, 1993) to test the degree and significance of differences among the groups observed in the MDS plot. ANOSIM is analogous to the analysis of variance (ANOVA), but computes the *R*-statistic (the difference of mean ranks between and within groups) that measures the degree of similarity between pairs of samples. Thus, *R* equals 1 if all individuals within a population are more similar to each other than to any individual in another population and 0 if there is no difference between populations. ANOSIM incorporates an approximate randomization test to assess for statistical significance (Clarke and Warwick, 2001).

Univariate data analysis was performed using STATISTICA (version 6, StatSoft, Inc. 2004), whereas multivariate analyses were implemented in PRIMER program 5.0 (Clarke and Warwick, 2001, Plymouth Marine Laboratory UK). The similarity percentages (SIMPER) procedure in PRIMER was used to calculate the percentage contribution of each morphological character to the overall difference among groups.

In order to determine the association of external factors (latitude, longitude, precipitation, temperature and number of dry months) with the observed pattern of morphological variation, we conducted Spearman rank correlations (*r_s*) against single morphological characters. Likewise, matrix correlations (Mantel test) implemented in the program Zt (Bonnet and Van de Peer, 2002) were performed to test for association between geographical proximity, molecular distance, and environmental similarity with morphological variation. Partial-Mantel tests were used to evaluate the effects of environmental factors in phenotypic differentiation, while controlling for the effects of geographic proximity. Additionally, we evaluated the effects of geographic proximity in phenotypic differentiation, while controlling for environmental factors.

3. Results

3.1. Variation in scutellation

Except for labial scales and the post-ocular band width, other scutellation characters included in this study exhibit great levels of divergence among regions (Table 1). Number of supralabials ranged from 7 to 8, whereas the number of

Table 1
Geographical and sexual variation in *Bothrops asper* morphological characters. Abbreviation: n = sample size; SD = standard deviation; S = sex; F = female; M = male; Md, median; SC = statistical comparison (Mann-Whitney-U); MNCA, Mexico and Nuclear Central America; CICA, Caribbean Isthmian Central America; PCR, Pacific Costa Rica; CH, Chiriquí Province; CCP, Caribbean Central Panama; DRN, Darién; PC, Pacific Colombia; MV, Magdalena Valley; CC, Caribbean Colombia. Significant differences are shown in gray.

Región	S	n	Intermittal			Ventral			Mid-Body dorsals			Blotch number			Subcaudal		
			Md	SD	SC	Md	SD	SC	Md	SD	SC	Md	SD	SC	Md	SD	SC
MNCA	F	86	28.0	1.6	U = 2402 P = 0.0081	210.0	4.7	U = 3024 P = 0.605	27.0	0.9	U = 1229 P < 0.001	23	2.0	U = 2850 P = 0.263	63.0	3.6	U = 1003 P < 0.001
	M	73	27.0	1.6		209.0	4.3		25.0	1.0		23	2.0		69.0	3.5	
CICA	F	51	26.0	1.5	U = 736 P = 0.605	193.0	4.5	U = 731 P = 0.569	27.0	1.4	U = 980 P < 0.001	19	2.0	U = 785 P = 0.958	64.0	2.4	U = 174 P < 0.001
	M	31	26.0	1.7		192.0	5.7		25.0	0.6		19	1.8		69.0	3.4	
PCR	F	33	27.0	1.4	U = 275 P = 0.019	199.0	3.8	U = 345 P = 0.202	27.0	1.3	U = 231 P = 0.003	20	1.8	U = 373 P = 0.393	64.0	2.4	U = 71 P < 0.001
	M	26	26.0	1.3		197.0	5.1		25.0	1.4		19	1.8		71.0	3.2	
CH	F	14	27.0	1.1	U = 15 P = 0.071	205.0	4.5	U = 25 P = 0.379	27.0	1.0	U = 16 P = 0.078	22	2.4	U = 28 P = 0.517	64.5	3.5	U = 9 P = 0.017
	M	5	26.0	1.1		205.0	4.1		25.0	1.1		22	0.9		70.0	3.9	
CCP	F	19	26.0	1.8	U = 87 P = 0.144	195.0	3.2	U = 114 P = 0.662	27.0	1.2	U = 46 P = 0.002	17	1.9	U = 82 P = 0.095	65.0	2.7	U = 38 P < 0.001
	M	14	25.5	1.5		195.0	3.5		25.0	0.6		18	1.5		68.5	3.3	
DRN	F	8	25.0	1.7	U = 24 P = 0.431	195.5	5.9	U = 26 P = 0.529	27.0	1.0	U = 4 P = 0.004	17	1.7	U = 30 P = 0.875	61.5	1.7	U = 2 P < 0.001
	M	8	24.5	1.4		195.0	4.9		23.5	1.0		17	1.5		68.0	4.1	
PC	F	20	25.0	1.2	U = 93 P = 0.004	190.5	3.9	U = 185 P = 0.685	27.0	0.6	U = 210 P < 0.001	18	1.5	U = 135 P = 0.079	57.0	2.4	U = 35 P < 0.001
	M	20	24.0	1.0		189.5	4.1		25.0	0.4		18	1.5		64.0	2.7	
MV	F	50	27.0	1.4	U = 254 P < 0.001	201.0	3.4	U = 577 P = 0.298	27.0	0.8	U = 104 P < 0.001	20	1.6	U = 254.5 P < 0.001	60.0	3.3	U = 76 P < 0.001
	M	27	25.0	1.2		199.0	2.7		25.0	0.4		20	1.1		66.0	3.2	
CC	F	15	26.0	1.4	U = 71 P = 0.138	200.0	6.7	U = 74 P = 0.183	27.0	0.6	U = 20 P < 0.001	20	2.0	U = 104.5 P = 0.983	63.0	4.3	U = 33 P < 0.001
	M	14	25.0	1.1		197.0	5.3		25.0	1.2		20	1.6		65.0	2.5	

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M., et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae). *Toxicon* (2009) doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

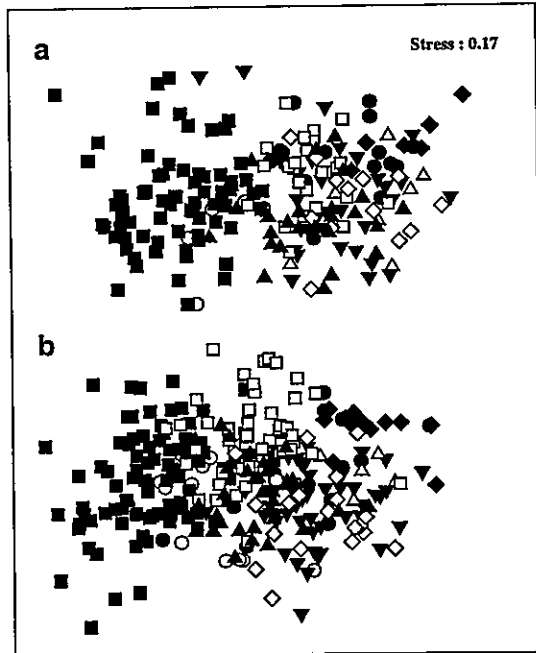


Fig. 2. Multidimensional scaling plot showing separation of *B. asper* males (a) and females (b) from nine physiographic regions in terms of meristic characters. An analysis of similarity supports significant clustering among several groups; see Table 2 for abbreviations and Anosim results.

infralabials varied from 9 to 12. Throughout the geographical range of the species, the post-ocular band varied between 0.5 and 2.0 scales wide. Neither of these variables show sexual dimorphism. Overall, the number of dorsal scale rows at mid-body ranged between 23 and 29, whereas

subcaudal scales ranged from 53 to 58 pairs. In general, males average fewer mid-body rows of dorsal scales and have more subcaudal scales than females, a trend that is sustained in all physiographic regions (Table 1). The number of interstitial scales varied from 22 to 33 in the overall sample; we found this trait to be sexually dimorphic in four regions evaluated (MNCA, PCR, PC and VM).

In general, ventral scales ranged from 182 to 220, but we did not find differences in the number of these scales between males and females at any region (Table 1). Likewise, we did not notice an effect of sex in the number of dorsal blotches at each region, except in Magdalena Valley, where blotches varied from 14 to 27 blotches (Table 1).

The overall pattern of morphological differentiation among physiographic regions is roughly congruent for males and females (Fig. 2, Table 2), although we detected some differences in the separation of regions located within Lower Central America (CICA, PCR, CCP, DRN). Thus, females from CICA differ from females from PCR and CCP, although the separation is weak as suggested by the low *R*-values obtained ($R < 0.17$ in both cases). Conversely, separation among males from those regions is not sustained in our analysis, and despite the barrier imposed by the central mountain axis of Costa Rica and western Panama, males from CICA do not differ morphologically from those from PCR (Table 2). Similarly, low *R*-values obtained suggest that males from PCR do not differ from those coming from CCP ($R = 0.01$, $P = 0.063$), although females do ($R = 0.29$, $P = 0.001$). As in these analyses the proportion of males and females at each region is similar ($\chi^2 = 7.96$, $df = 8$, $P = 0.446$), the observed differences in the resolution of Lower Central American regions by sex cannot be attributed to the effect of sample sizes differences.

In both sexes, snakes from Darien (DRN) do not differ morphologically from those from Caribbean and Central Panama (CCP), nor with those from other localities along

Table 2
ANOSIM results comparing *B. asper* males (a) and females (b) from nine physiographic regions. *R*-values are shown above diagonal ($R = 1$, if all individuals within a population are more similar to each other than to any individual in another population, and $R = 0$ if there is no difference between populations), *P*-values below diagonal (significance at $P < 0.05$, shown in gray). Region abbreviations as in Table 1.

	<i>n</i>	MNCA	CICA	PCR	CH	CCP	DRN	PC	MV	CC
(a)										
MNCA	73		0.66	0.48	0.00	0.73	0.81	0.89	0.49	0.50
CICA	31	0.001		0.04	0.47	0.01	0.05	0.36	0.22	0.17
PCR	26	0.001	0.061		0.34	0.10	0.21	0.63	0.21	0.28
CH	5	0.479	0.002	0.005		0.69	0.73	0.96	0.49	0.58
CCP	14	0.001	0.451	0.063	0.002		0.02	0.47	0.27	0.28
DRN	8	0.001	0.288	0.012	0.004	0.558		0.37	0.47	0.45
PC	20	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003		0.52	0.43
MV	27	0.001	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001		0.14
CC	14	0.001	0.029	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	
(b)										
MNCA	86		0.70	0.35	0.06	0.73	0.70	0.84	0.36	0.30
CICA	51	0.001		0.16	0.51	0.17	0.09	0.38	0.40	0.29
PCR	33	0.001	0.008		0.29	0.29	0.40	0.67	0.24	0.20
CH	14	0.237	0.001	0.002		0.58	0.60	0.87	0.41	0.19
CCP	19	0.001	0.003	0.001	0.001		0.08	0.54	0.53	0.33
DRN	8	0.001	0.159	0.001	0.001	0.274		0.32	0.36	0.03
PC	24	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.008		0.44	0.73
MV	50	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001		0.37
CC	11	0.002	0.002	0.016	0.005	0.001	0.576	0.001	0.001	

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M. et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884: Serpentes: Viperidae). Toxicon (2009). doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

Table 3

Contribution of morphological variables in the distinction of *B. asper* samples from various physiographic regions within the species distributional range. SIMPER analysis for males (a), and females (b). Below and above the diagonal the type of morphological variable and its contribution (%) are shown, respectively. Abbreviation: n = sample size; V, ventral scales; B, blotch number; I, interribral scales; S, subcaudal scales; NS, no significant. Region abbreviations as in Table 1. Gray areas represent the difference in type of variable between males and females.

	n	MNCA	CICA	PCR	CH	CCP	DRN	PC	MV	CC
(a)										
MNCA	73		(40.0)	(33.4, 27.8)	NS	(39.2)	(36.5, 30.2)	(35.19)	(30.2, 29.3)	(29.8, 25.2)
CICA	31	V		NS	(38.9)	NS	NS	(43.6)	(33.5, 31.5)	(38.0, 30.1)
PCR	26	B, V	NS		(31.8)	NS	(33.3, 27.3)	(48.5)	(49.0)	(53.6)
CH	5	NS	V	B		(40.7)	(37.9, 31.1)	(37.3, 32.8)	(47.3)	(52.3)
CCP	14	B	NS	NS	B		NS	(52.9)	(39.5)	(43.7)
DRN	8	B, V	NS	S, I	B, V	NS		(59.7)	(39.9)	(44.2)
PC	20	V	S	S	S, V	S	S		(33.8, 32.4)	(33.2)
MV	27	I, B	S, I	S	S	S	S	V, S		(44.4)
CC	14	I, B	S, I	S	S	S	S	V	S	
(b)										
MNCA	86		(42.8)	(30.2, 28.5)	NS	(41.5)	(34.4, 31.0)	(34.7)	(35.0)	(28.6, 26.3)
CICA	51	V		(37.0)	(36.7)	(36.5, 32.4)	NS	(47.3)	(35.7)	(29.5, 28.0)
PCR	33	V, B			(33.3)	(37.3, 35.7)	(38.1)	(40.0)	(52.2)	(33.3, 32.2)
CH	14	NS	V	B		(48.2)	(37.4)	(35.4)	(56.2)	(35.0)
CCP	19	B	I, B	B, I	B		(35.7)	(53.0)	(40.9)	(31.1)
DRN	8	B, V	NS	I	B	NS		(32.6, 31.9)	(33.0)	NS
PC	24	V	S	S	S	S	I, S		(29.2, 28.4)	(38.7)
MV	50	S	S	S	S	S	I	I, V		(41.2)
CC	11	I, V	S, V	S, I	S	S	NS	S	S	

the Caribbean of Costa Rica and Nicaragua (CICA). Overall, these results suggest that the populations from CICA and the Caribbean, Central and eastern regions of Panama (CCP and DRN) are very similar in the morphological characters examined.

In Fig. 2, samples from MNCA and those from CH separate from other regions in Lower Central America and South America (Table 2). In addition, for both sexes there is a high degree of overlap between samples from MNCA and CH, precluding morphological differentiation between them.

Among our South American samples, females from CC overlap with those from DRN ($P = 0.57$), but this result is not observed in the males ($P = 0.001$). Aside from this case, South American populations are clearly distinct from Middle American populations of both sexes, and are also distinct among themselves (Table 2). Thus, snakes grouped in the PC region are strongly differentiated from those from MV, and from those originating in CC ($P < 0.005$ in all cases). Likewise, snakes from CC differ from those in MV ($P = 0.001$), although the low R -values observed in males ($R = 0.14$, Table 2a) indicate some degree of morphological overlap.

Morphological variables that contribute to the distinction among *B. asper* from different biogeographic regions are depicted in Table 3. For both sexes, subcaudal scales separate snakes from South America (PC, MV, CC) from those in Lower Central America.

On the other hand, weak separation within Lower Central America samples (CICA, PCR, CCP, and DRN) is mainly driven by the effects of ventrals or blotch number (Table 3). The ventral number was also the variable that contributed most to differentiate MNCA with CICA and PC. The number of interribral scales for the males helps differentiate MNCA with MV and CC, whereas the number of subcaudal scales allows differentiate MNCA with MV in females (Table 3).

Among the South American groups, subcaudal scales contributed to the difference between MV and CC groups in both sexes, whereas ventral scales discriminate PC males from those from MV and CC. The interribral scales and the subcaudal scales allow PC females to be discriminated from MV and CC.

3.2. Molecular variation

We aligned 696 bp for *Cyt b* and 626 bp for *ND4*. No indels or stop codons were observed, as expected for protein-coding mitochondrial regions. Of the 1322 bp, 152 were variable and were 109 parsimony informative.

The GTR + Γ + G was identified as the optimal model of sequence evolution under the Akaike Information Criterion. Our phylogenetic analysis based in mitochondrial sequences suggests at least four clearly distinct lineages with high Bayesian posterior probabilities (PP = 1.0 in all cases, Fig. 3): (1) one line comprising by individuals from the Caribbean of Middle America [MNCA-CICA], (2) one that includes individuals from the Pacific slope of Costa Rica [PCR], (3) one that includes individuals from Darien and the Chococoan region [DRN-PC], and (4) a fourth lineage that includes localities in the Caribbean Coast and the Magdalena Valley of Colombia [CC-MV]. Although the molecular identity of samples from CH and CCP is unknown at present, the pattern determined from this analysis differs from the pattern depicted by morphological analysis.

Average p -distances uncorrected among groups and within groups of analyzed *B. asper* specimens are shown in Table 4. Mean divergence among groups ranged from 0.4% (between DRN and PC) to 6.3% (between MNCA and PCR). Within Middle American samples, MNCA and CICA groups are more genetically similar (3.4%) than either one is with PCR (6.2% and 5.2%, for MNCA and CICA respectively) and DRN groups (5.2% and 4.3%, for MNCA and DRN respectively).

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M., et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884: Serpentes: Viperidae). *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

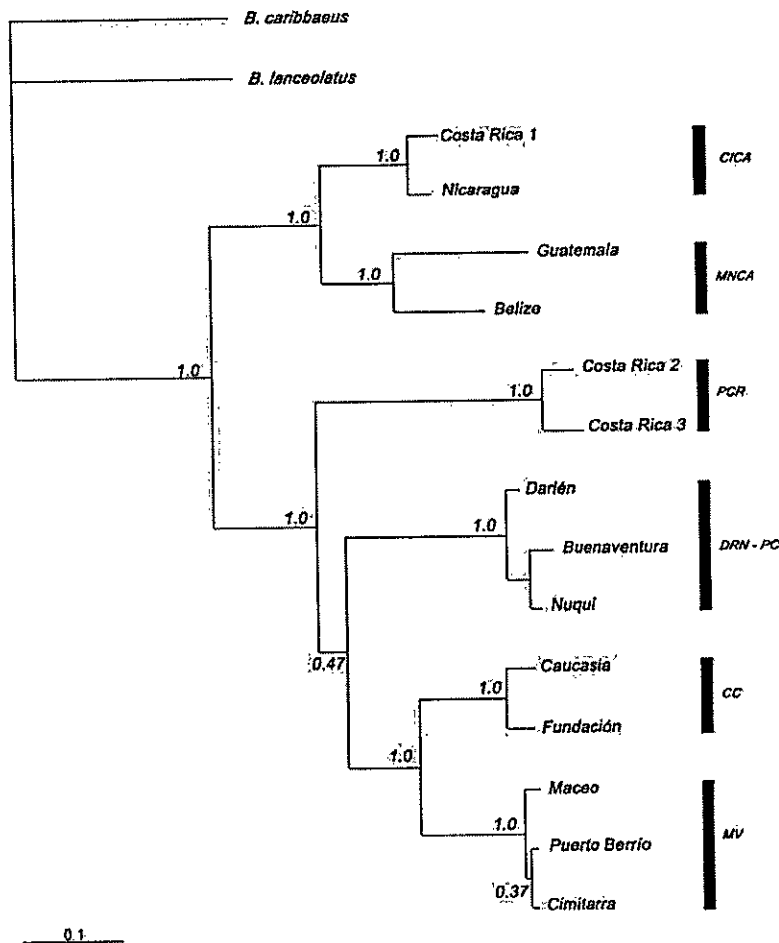


Fig. 3. Bayesian phylogenetic and posterior probabilities for groups based on the combined two - gene dataset analyzed under the GTR + Γ + G model. Tip labels include country or specific locality where *B. asper* specimens were sampled (Appendix 2). Group abbreviations as in text.

3.3. Correlation between morphological variation and environmental factors

The wide distributional range of *B. asper* in Middle and South America includes localities that varied not only in latitude and longitude, but that experience a great divergence in environmental parameters, including temperature, precipitation, and patterns of rainfall. Sampled localities range in latitude from 24°56'34.06"N in Tamaulipas (Mexico) to 4°57'54.11"N in Novita municipality (Chocó, Colombia). However, mean annual precipitation ranges from 550 mm in Mexico to 8000 mm in Lloró (Chocó, Colombia). Likewise, the number of dry months ranged from 0 in PC and some localities of CICA to 8 in Cortez (Honduras), and mean temperature varied from 16.5 °C in Olancho (Honduras) to 28 °C in several localities of Caribbean Cost in Colombia (Appendix 3). Localities that exhibit lowest mean precipitation have the longest dry season ($r_s = -0.682$, $P < 0.001$).

For males and females considered separately, morphological similarity is higher among regions that are in close proximity geographically. Not surprisingly, close regions share similarities also in precipitation and rainfall regime (Table 5), and therefore these two variables are also correlated with morphological distances (Table 5). The effects of precipitation and number of dry months over morphological distance persist even after removing the effects of geographic proximity (Table 5). In general, precipitation level is negatively correlated with the number of interterritorial scales, the number of ventral scales, blotch number, and subcaudal scales ($r_s < -0.246$, $P < 0.001$ for all correlations).

For both sexes, our analyses reveal weak correlation between morphological distances and mean annual temperature (Table 5). On the other hand, genetic divergence among regions, inferred from mtDNA sequences, is not related to snake morphological distance (Table 5), nor to any of the environmental variables included in these analyses. Except for the relationship between subcaudal scales in

Table 4
Mean (below diagonal) and standard error (above diagonal) of sequence divergence (*p*-distance) among *B. asper* groups and outgroup (*B. caribbaeus* and *B. lanceolatus*).

Groups		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Outgroup		0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
2	MNCA	0.068		0.006	0.010	0.009	0.008	0.009	0.009
3	CICA	0.064	0.034		0.010	0.008	0.008	0.009	0.008
4	PCR	0.070	0.063	0.058		0.007	0.008	0.009	0.009
5	DRN	0.067	0.052	0.043	0.037		0.008	0.009	0.009
6	PC	0.071	0.053	0.042	0.042	0.004		0.007	0.007
7	MV	0.063	0.057	0.046	0.041	0.026	0.030		0.004
8	CC	0.069	0.059	0.046	0.044	0.033	0.034	0.014	

males and the number of dry months, all other meristic characters exhibit a positive correlation with latitude and number of dry months: (a) Ventral scales: latitude ($r_s > 0.625$, $P < 0.001$, for both sexes); number of dry months ($r_s > 0.515$, $P < 0.001$, for both sexes). (b) Interrictal scales: latitude ($r_s > 0.392$, $P < 0.001$, for both sexes); number of dry months ($r_s > 0.193$, $P < 0.006$, for both sexes). (c) Blotch number: latitude ($r_s > 0.523$, $P < 0.0001$, for both sexes); number of dry months ($r_s > 0.324$, $P < 0.0001$, for both sexes). (d) Subcaudal scales: latitude ($r_s > 0.2000$, $P < 0.010$, for both sexes); number of dry months (females: $r_s = 0.293$, $P < 0.0001$; males: $r_s = 0.120$, $P = 0.091$). On the other hand, body length does not change in localities at different latitudes (females: $r_s = 0.062$, $P = 0.608$, $n = 70$; males: $r_s = 0.082$, $P = 0.516$, $n = 65$).

From these results, we conclude that, in general, reduced precipitation and increased latitude and number of dry months are correlated with higher number of interictal scales, ventral scales, subcaudal scales, and blotch number.

4. Discussion

4.1. Morphological vs molecular variation

The pattern of phenotypic variation revealed in this study is roughly congruent between sexes and it shows important distinction between snakes from MNCA and CH and those from Lower Central America. Snakes from all three regions separated by the Colombian Andes are also distinct, and they differ substantially from those from Middle American localities.

Four distinct molecular lineages that vary in their level of divergence are evident within *B. asper*. The first lineage considered, from Caribbean Middle America (MNCA and CICA), show high levels of mean sequence divergence from samples that arise in the Pacific slope Costa Rica, Darién and Colombia ($5.2 \pm 0.74\%$). The Caribbean distribution of *B. asper* in Middle America extends continuously along the coastal lowlands of the Gulf of Mexico, the Yucatan Peninsula and Central America, and currently there is no evident barrier that might prevent gene flow along these regions. Nevertheless, sequence divergence between MNCA and CICA is comparatively high ($3.4 \pm 0.9\%$).

Currently no obvious geographic barrier restricts gene flow between MNCA and CICA populations, but these regions were separated until late Pliocene by the Nicaraguan depression (Sasa, 2002; Savage, 2002). Thus, contact

between populations in MNCA and CICA might be a relatively recent event.

A second lineage includes samples from PCR. Localities within this region are separated from those in CICA by the Cordillera de Talamanca, the longest mountain range in Costa Rica and Panama that has a mean elevation that exceeds 2500 m. This range imposes an elevation barrier to the dispersal of *B. asper*, and accordingly might restrict gene flow between Caribbean and Pacific populations of this species (Table 5, but see Sasa and Barrantes, 1998). However, phenotypic differentiation between these regions is weak. Sequence divergence between PCR and samples from Darién and Colombia are also relatively high ($4.1 \pm 0.29\%$), thus supporting the distinctiveness of the PCR populations.

Table 5
Matrix correlation table, Mantel tests using 10,000 iterations. Abbreviation: *r*, correlation coefficient between matrices; *P*, probability.

Comparison matrices	Sex	<i>r</i>	<i>P</i>
Mantel test:			
morphological distances vs external factors			
Morphological vs geographic	M	0.332	<0.001
	F	0.311	<0.001
Morphological vs dry months	M	0.237	<0.001
	F	0.263	<0.001
Morphological vs precipitation	M	0.434	<0.001
	F	0.370	<0.001
Morphological vs temperature	M	0.125	<0.001
	F	0.093	<0.001
Precipitation vs geographic	M	0.210	<0.001
	F	0.190	<0.001
Dry months vs geographic	M	0.132	<0.001
	F	0.180	<0.001
Temperature vs geographic	M	0.104	0.002
	F	0.102	<0.001
Dry months vs precipitation	M	0.400	<0.001
	F	0.401	<0.001
Partial Mantel test:			
Morphological X dry months X geographic	M	0.207	<0.001
	F	0.222	<0.001
Morphological X precipitation X geographic	M	0.331	<0.001
	F	0.332	<0.001
Morphological X temperature X geographic	M	0.127	<0.001
	F	0.132	<0.001
Mantel test: genetic distance vs morphological and external factors:			
Genetic vs morphological		0.001	0.500
Genetic vs geographic		0.050	0.389
Genetic vs dry months		0.109	0.162
Genetic vs precipitation		0.165	0.147
Genetic vs temperature		0.026	0.378

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M., et al., Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae). *Toxicon* (2009). doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

A third lineage is composed of samples from DRN and PC, and therefore represents the Chocoan region. This biogeographical region extends to the Pacific coast, starting in eastern Panama, and continuing along western Colombia and northern Ecuador, and is characterized by low elevations (<300 m) and by high precipitation that allows the development of a rainforest with high levels of regional endemism (Kattan et al., 2004; Ron, 2008). No evident geographic barrier might prevent gene flow between PC and DRN *B. asper* populations, although some phenotypic differences were observed between them. Furthermore, mean sequence divergence between Chocoan populations and other Colombian groups is relatively high ($3.1 \pm 0.36\%$), and they are separated by the Cordillera Occidental and the Cordillera Central. These mountain ranges attained maximum elevation during Pliocene (2–5 mya) with an uplifting rate up to 3 mm/year during that period (Gregory-Wodzicki, 2000). Thus, it is probable that during this period much of the observed divergence between Chocoan and cis-Andean populations arose, as has been observed in other taxa (Cheviron et al., 2005; Noonan and Wray, 2006).

The fourth and last lineage considered is composed of samples from CC and MV that show low levels of sequence divergence ($1.4 \pm 0.4\%$), and exhibit some weak phenotypic differentiation. Gene flow between MV and CC *B. asper* populations might be possible along the Magdalena River Basin.

Therefore, phenotypic differentiation is not congruent with the phylogenetic relationships observed at the intra-specific level in *B. asper*, and other hypotheses should be invoked to explain morphological variation.

4.2. Effects of environmental factors and adaptation

In Middle America, dry conditions (lower precipitation, longer dry season) decrease from west to east (Pacific to Caribbean) and increase from south to north (Vargas, 2004). In contrast, in Colombia the rainfall is greater in the Pacific lowlands (mean precipitation > 3000 mm) and diminishes northward to the Caribbean region (Appendix 3). Hence, the driest localities in the range of *B. asper* are those in MNCA, CH, PCR, and CC (mean precipitation <2200 mm, <2250 mm, <2450 mm, and <2500 mm, respectively). In addition, individuals from these same regions show the greatest number of scales and dorsal blotches.

The correspondence between dryness and number of scales is known in other species of Squamata (Soulé and Kerfoot, 1972; Thorpe and Baez, 1987; Brown et al., 1991; Malhotra and Thorpe, 1997), and may reflect a causal effect of the environment (Castellano et al., 1994).

In one hand, environmental conditions during pregnancy are known to have an effect in some scale numbers in snakes (Fox, 1948; Osgood, 1978; Lourdaís et al., 2004). For instances, Osgood (1978) induced changes in scutellation at various treatments of temperature during embryonic development in *Natrix fasciata*. However, the magnitude of differences observed in his experiment was less than one standard deviation from the mean, a much smaller difference than the observed variation in nature. Furthermore, several researchers (Arnold, 1988; Arnold and Peterson, 1989) suggest that environmental induction might

contribute minimally to phenotypic variance in snakes, and is not likely the sole cause of this phenomenon.

Alternatively, phenotypic variation in the scale number of *B. asper* might have an adaptive origin, and be a consequence of selection acting to confront local environmental conditions (Castellano et al., 1994). For instance, Soulé and Kerfoot (1972) suggested that differences observed in mid-dorsal scales in the spiny lizard *Sceloporus graciosus* result from local adaptation to thermoregulation, whereas Horton (1972) indicate that in different skink species genus *Ergenia* scutellation differences result from the control of water loss.

According to Bentley and Schmidt-Nielsen (1966), between 25 and 50% of the water loss in lizards and snakes is cutaneous, depending on the species, physiological state, and environmental conditions. For this reason, scutellation determines the surface area of skin that is exposed to the environment (Soulé and Kerfoot, 1972), and in general, interstitial area is inversely related to the number of scales and proportional to scale size. Thus, an increase in scale number might reduce the skin surface area exposed and in this way allows better protection against water loss in drier climates.

Sanders et al. (2004) indicate that this adaptation might be important in vipers that require distending the body while consuming large prey items, thus increasing and exposing interstitial skin surface area. In *B. asper*, selection might act in a similar way to facilitate water preservation in drier localities.

4.3. Extent of ecotypic variation and final remarks

If selective forces shape morphological variation, they might also account for the taxonomic confusion of *B. asper* and related species. For instance, Markežich and Taphorn (1993) failed to distinguish between *B. asper* and *B. atrox* in a suspected zone of sympatry in western Venezuela, and suggested that the phenotypic variation found “may be caused by heterogeneous selection pressures associated with these varied communities operating on a particularly broad genome” (Markežich and Taphorn, 1993). Hence, statistical overlap observed in traits traditionally used in classification of lanceheads (Wüster et al., 1996; Gutberlet and Harvey, 2004) might result from ecological convergence and thus, the taxonomic value of these characters must be regarded with caution.

Our analysis suggests that selection can act at very subtle levels of environmental differentiation. As new evidence accumulates on the biological impacts of global climate change (Parmesan and Yohe, 2003; Root et al., 2003) it is tempting to speculate that morphological differentiation in *B. asper* (and other snakes) could be affected by climate changes acting at regional scales (Hulme and Sheard, 1999; Zwiers and Zhang, 2003). Millien et al. (2006) suggest that ecotypic variation (observed geographical variation in response to variation in the local environment) can also be influenced by climate change. This view is evidenced by the changes in body size in several contemporary species attributed to climate change (Smith and Betancourt, 1998; Yom-Tov, 2001; Yom-Tov et al., 2006), and climate change is predicted to have an even greater impact on animal morphology and ecology in the future (Hughes, 2000; McCarty, 2001; Kinnison and Hendry, 2001; Hairston et al., 2005).

In conclusion, our analysis demonstrates that phenotypic variation in *B. asper* might be an adaptive response to differences in dryness at a local scale. The effects of environmental factors in shaping morphological characters in lanceheads should be considered if proper understanding of character evolution and reliable species identification is desired, especially in cases of taxa that are broadly dispersed over variable environments.

Acknowledgements

We thank the curators and personnel of the museums cited in the text; specially to Jonathan A. Campbell (University of Texas at Arlington); Janeth Lucía García, Vitelbina Núñez and Jorge Enrique Asprilla (Programa de Ofidismo/Esorpionismo, Universidad de Antioquia); Vivian Páez and Juan Pablo Hurtado (Museo de Herpetología, Universidad de Antioquia); Danilo Chacón, Santos Rodríguez, Fabian Bonilla, and Aaron Gómez (Instituto Clodomiro Picado) for allowing us to use specimens under their care. Frank F. Joyce and William W. Lamar review the manuscript and provide important suggestions to improve it. Permits for tissue samples came from Javier Guevara (Oficina Ventanilla Unica, MINAE, Costa Rica) and Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales, Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia (Resolución No. 1392 del 01 de agosto del 2008 to MMSC). Data presented here was partially funded by a doctoral grant from CONICYT to MMSC (Proyecto Beca AT-24060101) and a grant from Vicerrectoría de Investigación, UCR 741-A5-050 to MS.

Conflict of Interest

The authors declare that there are not conflicts of interest regarding this manuscript.

Appendix 1. Material examined

Abbreviations of the institutions

AMNH: American Museum of Natural History, 79th St. & Central Park West, New York, New York 10024. **CAS:** California Academy of Sciences, Golden Gate Park, San Francisco, CA 94118. **FMNH:** Field Museum of Natural History, Roosevelt Road & Lake Shore Dr., Chicago, IL 60605. **ICP:** Instituto Clodomiro Picado. **MHUA:** Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, Calle 67 No. 53-108. **MUTCH:** Museo Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Colombia. **KU:** University of Kansas, Museum of Natural History, Lawrence, Kansas 66045. **LACM:** Los Angeles County Museum of Natural History, 900 Exposition Blvd, Los Angeles, CA 90007. **MVZ:** University of California at Berkeley, Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, CA 94720. **SUA:** Serpentario Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, Carrera 50ª No. 63-65. **TCWC:** Texas A&M University, Texas Cooperative Wildlife Collection, College Station, TX 77843. **USNM:** National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, D.C. 20560. **UTA:** University of Texas at Arlington, Merriam Museum Arlington, TX 76019.

Bothrops asper. **Belize:** Manatee Rd. (FMNH 3480, 4197); Cayo: Privason Creek, Mountain Pine Ridge (AMNH 126449, 126450); 0.4 mi S Belmopan on Hummingbird Hwy (KU 157657); Toledo: Blue Creek Village (UTA R-11072). **Colombia:** Acandí (MHUA 14065); Alto Baudó (SUA 203); Apartadó (SUA 983, 980); Bahía Solano (SUA 1223, 1406, 1405); Cáceres (SUA 2256); Caracolí (SUA 1404, 1773, 2995); Carepa (SUA 1113, 1178, 1298, 1300, 3241, 1178, 1300, 3241); Cauca (MHUA 14447; SUA 816, 978, 460, 957, 2375, 986, 1380, 2321, 2379, 2698); Chigorodó (SUA 1169, 1170, 1172, 1216, 1334); Cimitarra (SUA 390, 932, 1506, 1691, 1875, 2388, 2446, 2464); El Bagre (SUA 1405); Gómez Plata (SUA 3318, 3319); La Victoria, Caldas (MHUA 14322, 14385, 14444); Ibagué (SUA 2990); Istmina (SUA 312, 313, 1861); Lloró (SUA 3818; MUTCH 001, 008); Maceo (SUA 1681, 3123); Murindó (SUA 1622, 1623); Mutatá (SUA 255); Necoclí (SUA 2937); Novita (MUTCH 003, 004, 007); Nuquí (MHUA 14034, 14437, 14438); Ocaña (SUA 3395); Planeta Rica (SUA 2909); Porce (SUA 298, 320, 3323, 3367); Posamanza (SUA 545, 544, 600, 1575, 1576); Puerto Berrío (SUA 215, 234, 402, 557, 616, 658, 776, 1278, 1689, 2119, 2243, 2633, 2680, 2720, 2721, 3375); Puerto Nare (SUA 1381, 1311); Puerto Triunfo (SUA 497); Puerto Valdivia (SUA 2696); San Carlos (SUA 2040, 2043, 2237, 2296, 2344, 2416, 2978); San Francisco (SUA 772); San José del Nus (SUA 3137); San Luis (SUA 420, 1986, 2359, 2389, 2783, 2875); San Miguel (SUA 3783); San Rafael (SUA 2307, 3333, 3605); Sonsón (SUA 2782); Tierralta (SUA 2273, 2293; MHUA 14327, 14328); Turbaco (SUA 3849, 3850); Turbo (SUA 453, 1313, 1382); Usiacurí (MHUA 14187); Vegachí (SUA 1774, 2712, 2732, 2784, 3346, 3355, 3626, 3641, 3654, 3710); Vigía del Fuerte (SUA 1613, 1686); Yalí (SUA 1508); Yolombó (SUA 3050); Yondó (SUA 744). **Costa Rica:** Alajuela: Santa Clara (AMNH12770); Ciudad Quesada (LACM 114147-48); Cartago: Turrialba (AMNH 69720; KU 30963, 30999, 31008, 34007, 56004); Moravia de Turrialba: (KU 63197); Pavones (UTA R-12921-27, 12931-38, 14507-10); Guanacaste: Tenorio: Finca Las Flores (KU 34008-10); Heredia: Paso Azul (AMNH 17337, 17386); Puerto Viejo (KU 103908, MVZ 206329), La Virgen (KU 63915); Sarapiquí (ICP 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405); Limón: Limón (AMNH 17380, 17382, UTA R-34157), Guápiles (AMNH 64448), Tortuguero (AMNH 89163-65, LACM 131113), Penshurt (AMNH 99681), El Diamante (KU 25677), Linda Vista de Siquirres (UTA R-12996); Puntarenas: Pto. Jiménez (AMNH 17278), 4.5 km Rincón de Osa (KU 102537, LACM 114149), 14 km NW Buenos Aires (KU 63916), Golfito (LACM 59196), Río Peñas Blancas (UTA R-32494); San José: no other locality (AMNH 17384); Bajo Perez (ICP 1306-09, 1311, 1314-16, 1318, 1322-26, 1329-30, 1332, 1336, 1341-1346, 1348, 1352-55, 1358, 1360-61); Siquirres (ICP 1362-72, 1374, 1386-90). **Guatemala:** Alta Verapaz: Sierra de Las Minas, Pueblo Viejo (UTA R-26636, 26638, 26640), 1 km S (air) Finca Tinajas (UTA R-26637); Escuintla: S Slope Volcán de Agua, Finca Rosario Vista Hermosa (UTA R-21877-78, 21882, 21885, 21886-91, 21893-4, 21898-901, 21906); Izabal, Los Amates, Sierra del Espíritu Santo (KU 191151-52, UTA R-28620), Montañas del Mico, WSW Puerto Santo Tomás, Las Escobas (KU 191154-58, 191503, UTA R-14531, 21905, 23062); Las Dantas, El Estor (MVZ 160504-05, UTA R-8834, 15651,

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M., et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884: Serpentes: Viperidae). *Toxicon* (2009). doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

21872), Mariscos (UTA R-21873), Canoas (UTA R-21907), Sierra de Santa Cruz, Finca Semuc, 1 km rd S headquarters (UTA R-26643–44), Morales, Sierra de Caral, Aldea Negro Norte (UTA R-37430); Petén: 25 km Flores (AMNH 110664–65), Sojío, 12 km S of La Libertad (AMNH 69972), 8 mi S Uxactún (KU 157658), Tikal (UTA R-22226, 35017), 15 km NW Chinajá (KU 55704), Sayaxché (KU 57138), Quiriguá (AMNH 122764); Quetzaltenango: Finca El Carmen, km 197 on CA-2 (UTA R-21904). **Honduras:** Atlántida: Quebrada de Oro (KU 200507); Copán: Quebrada Grande (KU 200621); Cortez: Agua Azul (AMNH 26151); Lancetilla (AMNH 46952); Olancho: Sierra de Agalta (FMNH 236415); Toro: 6 km S El Progreso (MVZ 171546), no other locality (AMNH 29965, 32573); **Mexico:** Chiapas: Mal Paso (TCWC 21546), La Esperanza (AMNH 66455, USNM 110433), Ruinas de Palenque (KU 94137, USNM 110430, Chicharras (USNM 46602), Sabana de San Quintín (KU 94138); Oaxaca: Temescal MVZ 78100, 10 mi S Oaxaca (MVZ 150506), Santo Domingo (USNM 47931–32), 12.7 km Valle Nacional Bridge (UTA R-14529), Sierra Juárez, Metates (UTA R-14530, 25850); Puebla: Hueytamalco (AMNH 123919); San Diego (AMNH 58225), Vegas de Suchi (AMNH 58231), Necaxa, Río Necaxa (AMNH 76433); Quintana Roo: Xkanha, boundary of Campeche and Quintana Roo (AMNH 7860), 9 km W Puerto Juárez (KU 70908), 12 km N of Tulum (CAS 150329–30, UTA R-17095), Pueblo Nuevo X-Can (KU 70907), 17.9 mi NE Felipe Carrillo (KU 157659, 171742), 8.1 mi SW Vicente Guerrero (KU 157661), 22 km N Kantunil Kin (KU 171758), Caobas, 86 km W Chetumal (KU 75003), Cancún Airport (MVZ 160199), between Tulum and Coba at km 14 (UTA R-17031); San Luis Potosí: Antigua Morelos, Salto de Agua (TCWC 6974, AMNH 110389, KU 24033), Chapulhuaco, Hidalgo (AMNH 67315), 2 mi W Tamuin (AMNH 93434), 10 mi W Ebano (KU 24032), Xilitla region (KU 24080); Tabasco: Zapato Junction (CAS 114091), 14 mi NE Macultepec (KU 157662), Teapa (USNM 46406), no other data; Tamaulipas: no other data (CAS 71773), Río Sabinas (LACM 20229–31); Veracruz: Río Quetzalpan (TCWC 19157), 2 mi E Tabarca, Lago Catemaco (TCWC 21394, MVZ 76142), 2 km NW Sontecomapan (TCWC 21395), Los Tuxtlas (TCWC 21396, 21912), 21 mi E Las Chaspas (TCWC 21397), Palmilla, Tlacopayan (AMNH 4290), Veracruz (AMNH 79034), Tezonapa (CAS 74396), SW Jesus Carranza (KU 23915, 23995–97,

27008), 20 km ENE Jesús Carranza (KU 27009–11, 27565–67), Paso del Macho (KU 26473), Mirador (USNM 25047–48, 25212), Orizaba (USNM 30220), San Rafael (USNM 32149), 7 km NW Sontecomapan (UTA R-2748, 2920, 3021, 3063, 9444, 9460), W slope Santa Marta (UTA R-3010), 12 mi NW Tuxpan (AMNH 93435), Mirador (USNM 25046); Yucatan: 12 mi S Río Lagartos (KU 75004); Campeche: Encarnación (FMNH 105314–16), 8 km N Xpujil (KU 75001); no other data. **Nicaragua:** Zelaya: El Recreo (KU 112957–58, 125013), Cukra trail to Kanawa (AMNH 12705), Kanawa (AMNH 12708), Bluefields (AMNH 12707–09), Cupitna Camp (AMNH 12711–12), Río Huahuasban (AMNH 70244), Río Cama (AMNH 7413), Kyras, Musawas Waspues River (AMNH 75221); **Panama:** Bocas del Toro: Río Changuinola, Queb. Guabo, 16 km W Almirante (AMNH 119093–95, KU 107849), Río Chico (AMNH-64447), Península Valiente (KU 96986); Chiriquí: no further data (MCZ 26882–94), 16 mi W Potrerillos (MVZ 35563–67), Pan-American Highway, 27 mi NW David (MVZ 78768); Cristóbal (AMNH 36189); Darién: Río Subcutí (AMNH 36209), Turia Valley (CAS 71738–41), Río Tuira at Río Mono (KU 97031, 107853–56), El Real (KU 107857–58, 80603), Río Chucunaque, 7 km above Río Mortí (KU-107859–62), Santa Fe, Río Sabana (KU 112571), Yaviza (MVZ 83439–40); Panamá: Altos de Maja (AMNH 109640), Barro Colorado Island (AMNH 63409, 85616, MVZ 78076), Canal Zone, Ft. Clayton (AMNH 81974, FMNH 31743, KU 107850–52, 112572), Canal Zone, Curundu (KU 75765, 80276–81), Midbasin Chagres and mouth of Piquini River (MCZ 37086–88), Tocumen Airport, Panamá (MVZ 78769); San Blas: Camp Sasardi (KU 112569), Camp Summit (KU 112570).

Appendix 2. Origin and vouchers of samples used in molecular analyses included in this study

Appendix 3. Specimen localities and climate information

The first number correspond to latitude (UTM), the second is longitude (UTM), the third is mean annual precipitation (in mm), the fourth is mean annual temperature (in °C) and, the fifth data correspond to number of dry months per year (see Material and Methods), reported in

Specie	Locality, country	Voucher	Cyt b, ND4
<i>B. caribboeus</i>	Grande Anse, Saint Lucia		AF292598, AF292636
<i>B. lanceolatus</i>	Martinique		AF292599, AF292637
<i>B. asper</i>	Metagalpa, Nicaragua	ENS 9834	FJ985705
<i>B. asper</i>	San Carlos, Alajuela, Costa Rica	ICP 0404	FJ985706, FJ985716
<i>B. asper</i>	Quebrada Ganado, San José, Costa Rica	MZUCR-11152	AY223599, U41876
<i>B. asper</i>	Acosta, San José, Costa Rica	ICP Pac 0202	FJ985704
<i>B. asper</i>	Petén, Guatemala	ICP 1150	FJ985707
<i>B. asper</i>	Mile 38, Western Highway, Belize Zoo		A292600, AF292638
<i>B. asper</i>	Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia	INS 860	FJ985702, FJ985713
<i>B. asper</i>	La Changa, Darién, Panamá	ICP 1286	FJ985701, FJ985715
<i>B. asper</i>	Nuquí, Chocó, Colombia	MHUA 14438	FJ985703, FJ985714
<i>B. asper</i>	Caucasia, Antioquia, Colombia	MHUA 14447	FJ985699, FJ985711
<i>B. asper</i>	Fundación, Magdalena, Colombia	SUA 3971	FJ985700, FJ985712
<i>B. asper</i>	Cimitarra, Santander, Colombia	SUA 1691	FJ985698, FJ985710
<i>B. asper</i>	Maceo, Antioquia, Colombia	MHUA 14311	FJ985697, FJ985709
<i>B. asper</i>	Puerto Berrio, Antioquia	SUA 2721	FJ985696, FJ985708

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M., et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the reiclopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae). Toxicon (2009). doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

each locality. Sources for climate data are as follow. Belize: National Meteorological Service (NMS, <http://www.hydromet.gov.bz>). Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) de Catalogo de Publicaciones Web (<http://www.ideam.gov.co>). Middle America, Vargas (2004). Costa Rica: Solano and Villalobos (2001). Guatemala: Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología (<http://www.insivumeh.gob.gt>). México, Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del agua (CONAGUA) (http://smn.cna.gob.mx/smmpt/smn_a2.html). Panamá: Hidrometeorología, (<http://www.hidromet.com.pa>).

Belize: Cayo: 16.8327, –90.3026, 1800, 26.1, 2; Toledo: 16.2490, –88.8682, 1800, 26.1, 2. **Colombia:** Acandí: 6.8703, –75.1664, 3000, 28.0, 0; Alto Baudó: 5.7098, –76.9927, 5000, 28.0, 0; Apartadó: 7.8813, –76.6517, 3180, 27.2, 0; Bahía Solano: 6.2226, –77.4012, 4982, 25.6, 0; Cáceres: 7.5800, –75.3500, 1032, 28.0, 4; Caracolí: 6.8703, –75.1664, 3000, 27.0, 3; Carepa: 7.7700, –76.6600, 4000, 28.0, 2; Cauca: 7.9900, –75.2100, 1032, 28.3, 4; Chigorodó: 7.6622, –76.6861, 5000, 28.0, 2; Cimitarra: 6.3175, –73.9521, 2700, 28.0, 1; El Bagre: 6.2960, –74.7262, 2176, 28.0, 1; Gómez Plata: 6.6800, –75.2200, 3000, 28.0, 2; La Victoria, Caldas: 5.3167, –74.9125, 2500, 26.0, 0; Ibagué: 4.4500, –75.2400, 1800, 28.4, 0; Istmina: 5.1437, –76.6801, 7000, 25.9, 0; Lloró: 5.5100, –76.6800, 8000, 28.0, 0; Maceo: 6.55, –74.7900, 3000, 23.0, 1; Murindó: 6.9658, –76.7502, 5000, 28.0, 0; Mutatá: 7.2500, –76.4400, 2500, 28.0, 0; Necoclí: 8.4300, –76.7900, 3000, 27.4, 2; Novita: 4.9394, –76.6232, 8000, 28.0, 0; Nuquí: 5.7100, –77.2700, 7000, 26.0, 0; Ocaña: 8.2326, –73.3569, 863, 26.0, 5; Planeta Rica: 8.4200, –75.5800, 2000, 28.3, 4; Porce: 6.5500, –75.2333, 3000, 28.0, 2; Posamanza: 6.1300, 77.3200, 7000, 28.0, 0; Puerto Berrío: 6.5060, –74.3742, 3000, 28.2, 1; Puerto Valdivia: 7.2824, –75.3943, 2000, 28.3, 1; San Carlos: 6.1880, –74.9904, 3000, 24.0, 2; San José del Nus: 6.2456, –74.9904, 3000, 28.0, 2; San Luis: 6.2644, –73.1509, 3000, 24.0, 1; San Rafael: 6.3049, –75.0249, 3000, 26.0, 2; Sonsón: 5.8700, –74.9400, 3000, 22.0, 1; Tierralta: 8.1800, –76.0788, 2000, 28.3, 4; Turbo: 10.3400, –75.4200, 793, 27.7, 4; Turbo: 8.0955, –76.7483, 3180, 27.2, 0; Usiacurí: 10.7399, –74.9840, 814, 27.4, 5; Vegachí: 6.7700, –74.8000, 3000, 23.0, 2; Vigía del Fuerte: 6.7882, –76.9060, 7000, 28.0, 0; Yalí: 6.6408, –74.8541, 3000, 23.0, 3; Yolombó: 6.6000, –75.0100, 2647, 21, 3; Yondó: 7.0048, –73.9286, 2799, 28, 1. **Costa Rica:** Alajuela: 10.3792, –84.4404, 2100, 23.6, 4; Bajo Pérez, Acosta: 9.8012, –84.1617, 2370, 20.3, 4; Cartago: 9.8824, –83.6227, 23, 19.2, 2; Guanacaste: 10.4877, –85.3549, 2462, 27.1, 5; Heredia: 10.3778, –83.9601, 2000, 19.8, 3; Sarapiquí: 9.8418, –83.5972, 4000, 25.3, 0; Limón: 10.0700, –83.4500, 4860, 25.7, 0; Puntarenas: 9.2046, –83.3336, 2100, 27.0, 5; San José: 9.9365, –84.1000, 2000, 20.3, 5; Siquirres: 10.1014, –83.3705, 4000, 26.0, 0. **Guatemala:** Alta Verapaz: 15.5304, –90.1569, 1956, 26.8, 4; Escuintla: 14.1554, –98.9759, 1860, 27.2, 4; Izabal: 15.5197, –88.9274, 1676, 27.8, 3; Petén: 16.8845, –90.3144, 1800, 26.8, 4. **Honduras:** Atlántida: 15.5937, –87.1657, 2000, 21.2, 4; Copán: 14.8585, –89.0924, 688.8, 24.1, 6; Cortez: 15.4822, –88.0953, 800, 23.2, 8; Olanchito: 14.7989, –45.7689, 1317.2, 16.8, 6. **México:** Campeche: 19.7789,

–88.4910, 1794.2, 25.8, 4; Chiapas: 16.0875, –92.7802, 2190.7, 24.1, 5; Oaxaca: 18.0882, –96.1232, 1618, 22.4, 5; Puebla: 20.1824, –101.2597, 1254, 20.1, 4; Quintana Roo: 19.1142, –88.4909, 1457, 27.9, 7; San Luis Potosí: 22.0949, –88.4909, 808.4, 21.0, 6; Tabasco: 21.8031, –102.9282, 2036, 26.4, 4; Tamaulipas: 24.1757, –97.8388, 738.8, 23.0, 4; Veracruz: 18.5910, –95.0180, 1830.1, 23.7, 2; Yucatán: 20.6968, –89.1051, 1084.0, 25.9, 5. **Nicaragua:** Bluefields: 12.0667, –83.7500, 4285, 0. **Panamá:** Bocas del Toro: 9.3339, –82.2550, 3752, 27.4, 0; Chiriquí: 8.3816, –82.3215, 2500, 27.0, 3; Cristóbal: 9.3698, –79.3798, 3000, 26.7, 3; Darién: 8.0707, –78.2016, 3000, 27, 3; Panamá: 8.2213, –78.2168, 3000, 26.7, 3; San Blas: 9.2331, –78.2260, 3000, 25, 3.

References

- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571.
- Allsteadt, J., Savitzky, A.H., Petersen, C.E., Naik, D.N., 2006. Geographic variation in the morphology of *Crotalus horridus* (Serpentes: Viperidae). *Herpetol. Monogr.* 20, 1–63.
- Aragón, F., Gubensek, F., 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon* 19, 797–805.
- Arévalo, E., Davis, S.K., Sites Jr., J.W., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among 8 chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (*Phrynosomatidae*) in Central México. *Syst. Biol.* 43, 387–418.
- Arnold, S.J., 1988. Quantitative genetics and selection in natural population: microevolution of vertebral numbers in the garter snake *Thamnophis elegans*. In: Weir, B.S., Eisen, E.J., Goodman, M.M., Namkoong, G. (Eds.), *Proceedings of the Second International Conference on Quantitative Genetics*. Sinauer, Massachusetts, pp. 619–636.
- Arnold, S.J., Peterson, C.R., 1989. A test for temperature effects on the ontogeny of shape in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Physiol. Zool.* 62, 1316–1333.
- Auffenberg, W., 1955. A reconsideration of the racer, *Coluber constrictor*, in eastern United States. *Tulane Stud. Zool.* 2, 89–155.
- Bagnouls, F., Gaussen, H., 1957. Les climats biologiques et leur classification. *Ann. Geogr. Paris*.
- Behling, H., Hooghiemstra, H., Negret, A.J., 1998. Holocene history of the Chocó rain forest from laguna Piusbi, Southern Pacific lowlands of Colombia. *Quat. Res.* 50, 300–308.
- Bentley, P.J., Schmidt-Nielsen, K., 1966. Cutaneous water loss in reptiles. *Science* 151, 1547–1549.
- Bittner, T., King, R., 2003. Gene flow and melanism in garter snakes revisited: a comparison of molecular markers and island vs. coalescent models. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 79, 389–399.
- Boada, C., Salazar, D., 2005. The diet of *Bothrops asper* (GARMAN, 1884) in the Pacific lowlands of Ecuador. *Herpetozoa* 18 (short note).
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., 2002. zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *J. Stat. Softw.* 7, 1–12.
- Brown, R.P., Thorpe, R.S., Baez, M., 1991. Lizards on neighbouring islands show parallel within-island microevolution. *Nature* 352, 60–62.
- Brown, R.M., Ferner, J.W., Diesmos, A.C., 1997. Definition of the Philippine parachute gecko, *Ptychozoon intermedium* Taylor 1915 (Reptilia: Squamata: Gekkonidae): redescription, designation of a neotype, and comparison with related species. *Herpetologica* 53, 357–373.
- Burger, W.L., 1971. Genera of pitvipers (Serpentes: Crotalinae). Ph.D. Dissertation, University of Kansas, Lawrence, 186 pp.
- Calsbeek, R., Knouff, J.H., Smith, T.B., 2006. Variation in scale number is consistent with ecologically based natural selection acting within and between lizard species. *Evol. Ecol.* 20, 377–394.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Castellano, S., Malhotra, A., Torpe, R.S., 1994. Within – island geographic variation of the dangerous Taiwanese snake, *Trimeresurus stejnegeri*, in relation to ecology. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 52, 365–375.
- Cisneros-Heredia, D.F., Touzet, J.M., 2004. Distribution and conservation status of *Bothrops asper* (Garman, 1884) in Ecuador (Squamata: Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Herpetozoa* 17, 135–141.

Please cite this article in press as: Saldarriaga-Córdoba, M.M., et al. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884, Serpentes: Viperidae). *Toxicon* (2009). doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143.
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation, second ed. PRIMER-E, Plymouth, United Kingdom.
- Chevron, Z.A., Hackett, S.J., Capparella, A.P., 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 338–357.
- Chui, Y.W., Chen, H.C., Lee, S.C., Chen, C.A., 2002. Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail *Chipangopudina chinensis* (Mollusca: Gastropoda) in Taiwan. *Zool. Stud.* 41, 321–331.
- Dowling, H.G., 1951. A proposed standard system of counting ventrals in snakes. *Br. J. Herpetol.* 1, 97–99.
- Fox, W., 1948. Effect of temperature on development of scutellation in the gartersnake, *Thamnophis e. atratus*. *Copeia* 4, 252–262.
- Freire, A., Kuch, U., 1994. A note on the geographical distribution of *Bothrops asper* (Garman, 1883) in Ecuador. *Snake* 26, 135–139.
- Gans, C., 1964. A redescription of, and geographic variation in, *Liophis miliaris* Linné, the common water snake of southeastern South America. *Am. Mus. Novit.* 2178, 1–58.
- Garman, S., 1884. The reptiles and batrachians of North America. *Mem. Mus. Comp. Zool.* 8, 1–185 (dated 1883).
- Gaulke, M., Roesler, H., Brown, R.M., 2007. A new species of *Luperosaurus* (Squamata: Gekkonidae) from Panay Island, Philippines, with comments on the taxonomic status of *Luperosaurus cumingii* (Gray, 1845). *Copeia* 2, 413–425.
- Giraud, A.R., Arzamendia, V., Cacciali, P., 2006. Geographic variation and taxonomic status of the southernmost populations of *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae). *Herpetol. J.* 16, 213–220.
- Gnanadesikan, R., 1997. *Methods for Statistical Analysis of Multivariate Observations*. Wiley, New York.
- Gregory-Wodzicki, K.M., 2000. Uplift history of the central and northern Andes: a review. *Geol. Soc. Am. Bull.* 112, 1091–1105.
- Gutberlet Jr., R.L., Harvey, M.B., 2004. The evolution of new world venomous snakes. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 634–682.
- Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28, 341–351.
- Hairton Jr., N.G., Ellner, S.P., Geber, M.A., Yoshida, T., Fox, J.A., 2005. Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecol. Lett.* 8, 1114–1127.
- Horton, D.R., 1972. Lizard scale size and adaptation. *Syst. Zool.* 21, 441–443.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.R., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Hughes, L., 2000. Biological consequences of global warming: Is the signal already apparent? *Trends Ecol. Evol.* 15, 56–61.
- Hulme, M., Sheard, N., 1999. Escenarios de Cambio Climático para Mesoamérica. Unidad de Investigación Climática, Norwich, Reino Unido, 6 pp.
- Jiménez-Porras, J.M., 1964. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon* 2, 155–166.
- Jowett, T., 1986. Preparation of nucleic acids. In: Roberts, D.B. (Ed.), *Drosophila: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 275–286.
- Kattan, G.H., Franco, P., Rojas, V., Morales, G., 2004. Biological diversification in a complex region: a spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *J. Biogeogr.* 31, 1829–1839.
- Kark, S., Warburg, I., Werner, Y.L., 2003. Polymorphism in the snake *Psammophis schokariani* at both sides of the desert edge in Israel and Sinai. *J. Arid Environ.* 37, 513–527.
- King, R.B., 1997. Variation in brown snake (*Storeria dekayi*) morphology and scalation: sex, family, and microgeographic differences. *J. Herpetol.* 31, 335–346.
- Kinnison, M.T., Hendry, A.P., 2001. The pace of modern life II: from rates of contemporary microevolution to pattern and process. *Genetica* 112–113, 145–164.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinf.* 5, 150–163.
- Lessa, E.P., 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Syst. Zool.* 39, 242–252.
- Lomonte, B., Carmona, E., 1992. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 102, 325–329.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Guillon, M., Naulleau, G., 2004. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos* 104, 551–560.
- Malhotra, A., Thorpe, R.S., 1997. Microgeographic variation in scalation of *Anolis oculatus* (Dominica, West Indies): a multivariate analysis. *Herpetologica* 53, 49–62.
- Maltagliati, F., Camilli, L., Lardicci, C., Castelli, A., 2001. Evidence for morphological and genetic divergence in *Perinereis cultrifera* (Polychaeta: Nereididae) from two habitat types at Elba Island. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 81, 411–414.
- Markezich, A.L., Taphorn, D.C., 1993. A variational analysis of populations of *Bothrops* (Serpentes: Viperidae) from Western Venezuela. *J. Herpetol.* 27, 248–254.
- McCarty, J.P., 2001. Ecological consequences of recent climate change. *Conserv. Biol.* 15, 320–331.
- Millien, V., Lyons, S.K., Olson, L., Smith, F.A., Wilson, A.B., Yom-Tov, Y., 2006. Ecotypic variation in the context of global climate change: revisiting the rules. *Ecol. Lett.* 9, 853–869.
- Moreno-Arias, R.A., Medina-Rangel, G.F., Castaño-Mora, O.V., 2008. Lowland reptiles of Yacopi (Cundinamarca, Colombia). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 32, 93–103.
- Morrone, J.J., 2001. *Biogeografía de América Latina y el Caribe*. Manuales & Tesis SEA, nro. 3, Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza (España), pp. 55–56.
- Mulcahy, D.G., Archibald, M.A., 2003. Geographic variation in the Baja California nightsnake (*Eridiphas slevini*), with comments on taxonomy and diet. *J. Herpetol.* 37, 566–571.
- Mulcahy, D.G., 2008. Phylogeography and species boundaries of the western North American nightsnake (*Hypsiglena torquata*): revisiting the subspecies concept. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 1095–1115.
- Nicholas, K.B., Nicholas Jr., H.B., 1997. GenDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. www.Psc.edu/biomed/GenDoc.
- Noonan, B., Wray, K.P., 2006. Neotropical diversification: the effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. *J. Biogeogr.* 33, 1007–1020.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Osgood, D.W., 1978. Effects of temperature on the development of morphological characters in *Natrix fasciata*. *Copeia*, 33–46.
- Parkinson, C.L., Campbell, J.A., Chippindale, P.T., 2002. Multigene phylogenetic analyses of pitvipers, with comments on their biogeography. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Green, H.W. (Eds.), *Eagle Mountain Publishing*, Salt Lake City, UT, pp. 93–110.
- Parnesan, C., Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37–42.
- Puerto, G., Salomão, M.da G., Theakston, R.D.G., Thorpe, R.S., Warrell, D.A., Wüster, W., 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *J. Evol. Biol.* 14, 527–538.
- Ramírez-Avila, J., Quevedo, B.E., López, E., Renjifo, J.M., 2004. Purification and partial characterization of phospholipases A2 from *Bothrops asper* (Barba amarilla) snake venom from Chiriguáná (Cesar, Colombia). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 10, 242–259.
- Ron, S., 2008. Biogeographic area relationships of lowland Neotropical rainforest based on raw distributions of vertebrate groups. *Biol. J. Linn. Soc.* 71, 379–402.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C., Pounds, J.A., 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421, 57–60.
- Salomão, M.da G., Wüster, W., Thorpe, R.S., BBBSP, 1997. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotra, A. (Eds.), *Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite*. Symp. Zool. Soc. London, vol. 70, pp. 89–98.
- Santos, X., Pleguezuelos, J.M., 2003. Variación morfológica en la culebra lisa meridional *Coronella girondica* (Daudin, 1803) a través de su área de distribución. *Rev. Esp. Herpetol.* 17, 55–73.
- Sanders, K.L., Malhotra, A., Thorpe, R.S., 2004. Ecological diversification in a group of Indomalayan pitvipers (*Trimeresurus*): convergence in taxonomically important traits has implications for species identification. *J. Evol. Biol.* 17, 721–731.
- Sasa, M., Barrantes, R., 1998. Allozyme variation in populations of *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Herpetologica* 54, 462–469.
- Sasa, M., 2002. Morphological variation in the lancehead pitviper *Bothrops asper* (Garman) (Serpentes: Viperidae) from Middle America. *Rev. Biol. Trop.* 50, 259–271.

Please cite this article in press as: Saldarraga-Córdoba, M.M., et al., Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae) - *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.031

- Savage, J.M., 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas. University of Chicago, Press, Chicago.
- Smith, F.A., Betancourt, J.L., 1998. Response of bushy-tailed woodrats (*Neotoma cinerea*) to late quaternary climatic change in the Colorado Plateau. *Quat. Res.* 50, 1–11.
- Solano, J., Villalobos, R., 2001. Aspectos fisiográficos aplicados a un bosquejo de regionalización geográfica climática de Costa Rica. *Top. Meteor. Oceanogr.* 8, 26–39.
- Soulé, M., Kerfoot, W.C., 1972. On the climatic determination of scale size in a lizard. *Syst. Zool.* 21, 97–105.
- Taylor, H.L., Cooley, C.R., 1995. A multivariate analysis of morphological variation among parthenogenetic teiid lizards of the *Cnemidophorus cozumela* complex. *Herpetologica* 51, 67–76.
- Thorpe, R.S., 1976. Biometrics analysis of geographic variation and racial affinities. *Biol. Rev.* 51, 407–452.
- Thorpe, R.S., 1991. Clines and cause: microgeographic variation in the Tenerife gecko (*Tarentola delalandii*). *Syst. Zool.* 40, 172–187.
- Thorpe, R.S., McCarthy, C.J., 1978. A preliminary study, using multivariate analysis, of a species complex of African house snakes (*Boaedon fuliginosus*). *J. Zool. (Lond.)* 184, 484–506.
- Thorpe, R.S., Baez, M., 1987. Geographic variation within an island: univariate and multivariate contouring of scalation, size and shape of the lizard *Gallatia galloti*. *Evolution* 41, 256–268.
- Vargas, G., 2004. La escala zonal, regional y local en el análisis del régimen pluviométrico del Istmo Centroamericano. *Rev. Reflexiones* 83, 31–56.
- Venegas, P.J., Siu-Ting, K., Jordán, J.C., 2008. Notes on geographic distribution. Amphibia, Hylidae, *Hypsiboas pellucens*: first country record, Peru. *Check List* 4, pp. 214–217.
- Winer, B.J., Brown, D.R., Mitchels, K.M., 1991. *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill, New York.
- Wüster, W., Thorpe, R.S., Puerto, G., BBBSP, 1996. Systematics of the *Bothrops atrox* complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brasil: a multivariate analysis. *Herpetologica* 52, 263–271.
- Wüster, W., Salomão, M.G., Thorpe, R.S., Puerto, G., Furtado, M.F.D., Hoge, S.A., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 1997. Systematics of the *Bothrops atrox* species complex: insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: Thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotra, A. (Eds.), *Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite*. Symposia of the J. Zool. (Lond.), vol. 70. Clarendon Press, Oxford, pp. 99–113.
- Wüster, W., Thorpe, R.S., Salomão, M.da G., Thomas, L., Puerto, G., Theakston, R. D.G., Warrel, D.A., 2002. Origin and phylogenetic position of the Lesser Antillean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Zool.)* 68, 101–106.
- Yom-Tov, Y., 2001. Global warming and body mass decline in Israeli passerine birds. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 947–952.
- Yom-Tov, Y., Yom-Tov, S., Wright, J., Thorne, C.J.R., Du-Feu, R., 2006. Recent changes in body weight and wing length among some British passerine birds. *Oikos* 112, 91–101.
- Zwiers, F.W., Zhang, X., 2003. Toward regional-scale climate change detection. *J. Clim.* 16, 793–797.