



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA, USO E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

BRUNO FERREIRA GUILHON

AVALIAÇÃO DO *STATUS* TAXONÔMICO DE *Chironius flavolineatus* (JAN, 1863)
(SERPENTES: COLUBRIDAE) DO ESTADO DO CEARÁ

FORTALEZA

2023

BRUNO FERREIRA GUILHON

AVALIAÇÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE *Chironius flavolineatus* (JAN, 1863)
(SERPENTES: COLUBRIDAE) DO ESTADO DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Taxonomia, Sistemática e Evolução Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila.
Coorientador: Prof. Dr. Breno Hamdan.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G974a Guilhon, Bruno Ferreira.
Avaliação do status taxonômico de *Chironius flavolineatus* (Jan, 1863) (Serpentes: Colubridae) do estado do Ceará / Bruno Ferreira Guilhon. – 2023.
47 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila.
Coorientação: Prof. Dr. Breno Hamdan.
1. Espécies-crípticas. 2. Genética. 3. Morfometria. 4. Taxonomia. I. Título.

CDD 577

BRUNO FERREIRA GUILHON

AVALIAÇÃO DO *STATUS* TAXONÔMICO DE *Chironius flavolineatus* (JAN, 1863)
(SERPENTES: COLUBRIDAE) DO ESTADO DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Taxonomia, Sistemática e Evolução Biológica.

Aprovada em: 13/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Diva Maria Borges-Nojosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Joventino Roberto
Universidade Estadual do Cariri (UFCA)

AGRADECIMENTOS

Sou grato ao professor doutor **Robson Waldemar Ávila**, pela excelente orientação prestada no decorrer do trabalho, bem como pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa com taxonomia de serpentes. Me proporcionou experiências acadêmicas fantásticas, envolvendo a visita a coleções científicas e contato com demais pesquisadores pelo Brasil.

Também sou grato ao doutor **Breno Hamdan**, pelo acolhimento durante à fase de visita às coleções científicas do Rio de Janeiro, assim como pelos ensinamentos e valiosas ideias no decorrer das discussões sobre os resultados obtidos, no presente trabalho. Aprendi muito e sou imensamente grato pela oportunidade e por todo o apoio que me foi dado.

Aos professores, técnicos e curadores das coleções científicas visitadas: professor doutor **Daniel Mesquita** e doutor **Fagner Ribeiro Delfim** (CHUFPB); professor doutor **Pedro Nunes** (CHUFPE); professor doutor **Geraldo Jorge Barbosa de Moura**; professora doutora **Selma Torquato da Silva** e **Thayná Torres**; professor doutor **Paulo Passos**, doutora **Manoela Voitovicz Cardoso** e doutor **Pedro Pinna** (Museu Nacional), sou imensamente grato a todos. A amostragem de dados para o projeto só se tornou possível graças a receptividade de todos, bem como pelo empréstimo dos exemplares e de tecidos para extração do material genético.

Sou grato aos mestres **Vinícius Sudré dos Santos** e **Albedi Andrade Junior**, por terem me recebido e acolhido durante meu período de estadia no Rio de Janeiro, para a visita ao Museu Nacional, bem como pelas importantes discussões e debates sobre taxonomia e suas pesquisas desenvolvidas, que me permitiu acumular mais experiência e aprendizado sobre o tema.

Também sou grato a todos os membros do NUROF-UFC: **Castiele Holanda Bezerra**, **Roberta Rocha Braga**, **Matheus Callixto Saldanha**, **Inessa Maia Neumann**, **Átilas Rodrigues de Sousa**, **Tatiana Feitosa Quirino**, **Mariny Oliveira Arruda** e **Elvis Franklin Fernandes de Carvalho**, pelo apoio pessoal e também auxílio durante as viagens, expedições e experiências compartilhadas sobre herpetologia, taxonomia, ecologias, e muito mais, que me permitiram aprender e aplicar muito dos aprendizados em minha pesquisa e na vida. Sou especialmente grato a **Antônio Rafael Lima Ramos**, que me ajudou bastante a aprender e aplicar as análises estatísticas, dando mais robustez e relevância aos meus achados.

RESUMO

O gênero de serpentes *Chironius* Fitzinger 1826, apresenta um histórico de instabilidade taxonômica, tendo algumas de suas espécies renomeadas e classificadas em outros gêneros. Segundo estudos recentes, baseados em coalescência multiespécie, *Chironius flavolineatus* (Jan, 1863) têm sido proposta como um complexo de espécies, com a proposição de linhagens crípticas ao longo da sua distribuição, incluindo a população nativa do estado do Ceará. Contudo, as amostras de espécimes sequenciados são limitadas e, além disso, a coleta e análise de caracteres morfológicos, hemipênis e genética da população ainda não foi devidamente conduzida. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o *status* taxonômico da população atualmente identificada como *Chironius flavolineatus* no estado do Ceará, através de uma abordagem integrativa. Foram analisados caracteres merísticos, anatômicos e qualitativos de espécimes depositados em coleções científicas representativas da herpetofauna do Brasil. Ademais, sequências genéticas do gene 16S geradas no estudo, complementadas com outras disponíveis no GenBank, colaboraram para testar os limites entre as populações e suas relações evolutivas. O estudo recuperou parcialmente algumas hipóteses evolutivas referentes à espécie, como o forte suporte à população do estado de Goiás, geneticamente distinta das demais. A maioria dos caracteres morfológicos analisados de *C. flavolineatus* mostrou-se conservada. Contudo, notou-se variação estatisticamente significativa entre algumas medidas morfométricas e a foliose entre a população do estado do Ceará e as demais, principalmente nos machos, como CRC, CC, Cca e contagem de escamas subcaudais. Observou-se caracteres novos para a espécie e uma certa frequência da manifestação de alguns deles na população do estado do Ceará, apresentando também um hemipênis com características semelhantes à *C. diamantina*, uma espécie congênera. Tal achado pode representar pistas para acessar a história evolutiva das espécies do gênero, visto que os genes sequenciados disponíveis para consulta não apresentam bom sinal filogenético para a recuperação da filogenia do grupo. Apesar de caracteres morfométricos, morfologia hemipeniana e de foliose das subcaudais indicarem sinal taxonômico, considerou-se a amostragem ainda limitada, adotando-se assim parcimônia na tomada de decisões taxonômicas envolvendo o táxon. Dessa forma, manteve-se o *status* taxonômico da população de *Chironius flavolineatus* do estado do Ceará.

Palavras-chave: espécies-crípticas; genética; morfometria; taxonomia.

ABSTRACT

The snake genus *Chironius* Fitzinger 1826 has a history of taxonomic instability, with some of its species renamed and classified in other genera. According to recent studies, based on multispecies coalescence, *Chironius flavolineatus* (Jan, 1863) has been proposed as a species complex, with the proposition of cryptic lineages throughout its distribution, including the native population of the state of Ceará. However, the samples of sequenced specimens are limited and, in addition, the collection and analysis of morphological characters, hemipenis and population genetics has not yet been properly conducted. Therefore, the present study aimed to evaluate the taxonomic status of the population currently identified as *Chironius flavolineatus* in the state of Ceará, through an integrative approach. Meristic, anatomical and qualitative characters of specimens deposited in scientific collections representing herpetofauna in Brazil were analyzed. Furthermore, genetic sequences of the 16S gene generated in the study, complemented with others available in GenBank, collaborated to test the limits between populations and their evolutionary relationships. The study partially recovered some evolutionary hypotheses regarding the species, such as the strong support for the population in the state of Goiás, which is genetically distinct from the others. Most of the analyzed morphological characters of *C. flavolineatus* were conserved. However, a statistically significant variation was noted between some morphometric measurements and pholidosis between the population of the state of Ceará and the others, mainly in males, such as CRC, CC, Cca and subcaudal scale count. New characters for the species and a certain frequency of manifestation of some of them were observed in the population of the state of Ceará, also presenting a hemipenis with characteristics similar to *C. diamantina*, a congeneric species. This finding may represent clues to access the evolutionary history of the species of the genus, since the sequenced genes available for consultation do not present a good phylogenetic signal for recovering the phylogeny of the group. Although morphometric characters, hemipenis morphology and pholidosis of the subcaudals indicate a taxonomic signal, the sampling was still considered limited, thus adopting parsimony in making taxonomic decisions involving the taxon. In this way, the taxonomic status of the *Chironius flavolineatus* population in the state of Ceará is maintained.

Keywords: cryptic species; genetics; morphometry; taxonomy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1	Conjunto de dados	11
2.1.1	<i>Morfologia e morfometria</i>	11
2.1.2	<i>Preparação e anatomia do hemipênis</i>	12
2.1.3	<i>Conceito de espécie e delimitação de unidades taxonômicas operacionais</i>	13
2.2	Análise de dados	13
2.2.1	<i>Tratamento dos dados e análises estatísticas</i>	13
2.2.2	<i>Genética e filogenia</i>	14
3	RESULTADOS	17
3.1	Caracteres externos	17
3.2	Hemipênis	25
3.3	Análises evolutivas	27
4	DISCUSSÃO	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE A – LISTA DE VOUCHERS DOS MATERIAIS EXAMINADOS	43
	APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS GENÉTICAS DO GENE MITOCONDRIAL 16S UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS DO TRABALHO	44
	APÊNDICE C – COMPARAÇÃO DOS CARACTERES MORFOMÉTRICOS E MERÍSTICOS AFERIDOS DURANTE AS ANÁLISES DOS ESPÉCIMES DA TRÊS POPULAÇÕES DE <i>CHIRONIUS FLAVOLINEATUS</i>	47

1 INTRODUÇÃO

O gênero de serpentes (Squamata) *Chironius* Fitzinger, 1826 pertence à família Colubridae (PYRON; BURBRINK; WIENS, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2016). Distingue-se de outros gêneros de serpentes Neotropicais pela presença de 12 ou 10 fileiras de escamas dorsais ao meio do corpo, sendo encontradas desde a costa norte de Honduras até o Uruguai e o nordeste da Argentina, correspondendo assim a um táxon amplamente distribuído pela América do Sul (DIXON; WIEST; CEI, 1993) e que compreende 23 espécies válidas (UETZ *et al.*, 2023). No Brasil são registradas 15 espécies, incluindo cinco endêmicas, com representantes ocorrendo em todos os biomas desde áreas baixas até grandes altitudes, onde algumas espécies restritas e mais associadas a florestas ocorrem (FERNANDES; HAMDAN, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2019; ENTIAUSPE-NETO *et al.*, 2020). Segundo Dixon, Wiest e Cei (1993), são serpentes de médio a grande porte, semi-arborícolas, diurnas e com dentição áglifa. Os representantes do gênero apresentam hemipênis unilobado e com sulco espermático único, espinhoso centralmente e caliculado distalmente. Oposto ao sulco, há um *basal naked pocket* (bolso nu basal) e o lóbulo pode conter ou não diminutos espínulos na porção basal.

O táxon já foi classificado como parafilético (PYRON; BURBRINK; WIENS, 2013), entretanto estudos morfológicos e filogenéticos têm demonstrado robustamente o monofiletismo do clado (KLACZKO; MONTINGELLI; ZAHER, 2014; FIGUEROA *et al.*, 2016; HAMDAN *et al.*, 2017; TORRES-CARVAJAL *et al.*, 2019), bem como revelado uma diversidade de espécies subestimada dentro do gênero. Dessa forma, houveram descrições de novas espécies plenas (*e.g.* FERNANDES; HAMDAN, 2014; HAMDAN; FERNANDES, 2015; ENTIAUSPE-NETO *et al.*, 2020) e a proposição de linhagens evolutivamente distintas, formando complexos de espécies crípticas, dentre as populações de *Chironius flavolineatus* (Jan, 1823) (HAMDAN *et al.*, 2017); *C. exoletus* (Linnaeus, 1758); *C. fuscus* (Linnaeus, 1758); *C. monticola* Roze, 1952 e *C. multiventris* Schmidt & Walker, 1943 (HAMDAN *et al.*, 2017; TORRES-CARVAJAL *et al.*, 2019).

Chironius flavolineatus é uma espécie caracterizada por apresentar uma distinta faixa vertebral amarelada, ou branco-creme, que se estende por quase todo o comprimento do corpo; apresenta escudo cloacal dividido; no máximo duas fileiras de escamas dorsais quilhadas no meio do corpo e cor de fundo do ventre completamente branco-creme, ou amarelado, sem ornamentação (HAMDAN; FERNANDES, 2015). A espécie foi descrita baseada em apenas dois espécimes (sintipos), procedentes de “Brasile” e “Bahia” (*vide* JAN, 1863), tendo apenas um destes sido ilustrado, permitindo assim a posterior averiguação de

caracteres diagnósticos. Dessa forma, a espécie possui um histórico taxonômico e nomenclatural bastante problemático, com discussões sobre a devida autoria da espécie e até mesmo o desconhecimento acerca do paradeiro dos sítipos. Contudo, essas questões foram resolvidas após os estudos de Dixon, Wiest e Cei (1993) que reconheceram Jan, 1863 como o descritor da espécie, e de Hamdan, Scali e Fernandes (2014) que confirmaram a destruição de um dos sítipos, indicando o remanescente como o lectótipo da espécie. Entretanto, essa designação ainda perpetua a problemática secundária, posto que a localidade-tipo de *C. flavolineatus* continua inespecífica (*i.e.* Brasil) (JAN, 1863; HAMDAN; SCALI; FERNANDES, 2014), o que dificulta estudos taxonômicos envolvendo essa espécie e sua possível variação morfológica entre populações.

Em contraste com sua localidade-tipo imprecisa, a distribuição da espécie é bem conhecida e ampla, sendo registrada no Brasil, Paraguai e na Bolívia (HAMDAN; FERNANDES, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2019). No Brasil, pode ser encontrada em regiões de Floresta Amazônica; Cerrado; Caatinga; Mata Atlântica; Bosque seco Chiquitano e no Pantanal (NOGUEIRA *et al.*, 2019). Contudo, ao longo da sua distribuição, como apontado no trabalho de Hamdan *et al.* (2017), *C. flavolineatus* apresenta três prováveis linhagens evolutivamente distintas que podem consistir em espécies candidatas, para a Mata Atlântica de terras baixas no Rio Grande do Norte e na Paraíba, para a Serra da Ibiapaba no Ceará e para a Serra das Três Barras em Goiás. Dessa forma, *C. flavolineatus* pode configurar-se como um complexo de espécies crípticas, como apontado pelos referidos autores. Porém, nenhum estudo foi realizado para se avaliar o *status* taxonômico dessas populações nas referidas regiões geográficas.

Complexos de espécies crípticas são formados por pelo menos duas espécies morfológicamente similares que, a princípio, compartilham uma mesma classificação nominal (BICKFORD *et al.*, 2007), mas são distintas. Em vertebrados, esses complexos são encontrados, geralmente, em espécies de ampla distribuição e ocorrem em inúmeros táxons, como peixes (TORNABENE *et al.*, 2015; HOU *et al.*, 2018); anfíbios (FOUQUET *et al.*, 2012; FUNK; CAMINER; RON, 2012; VACHER *et al.*, 2017; TREVISAN *et al.*, 2020) e répteis (OLIVER *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2017; ROBERTO *et al.*, 2020), inclusive diversos casos são registrados em serpentes (RUANE *et al.*, 2018; JABLONSKI *et al.*, 2019; GRABOSKI *et al.*, 2023). A marcante presença de complexos de espécies crípticas encontrados nesse grupo pode ocorrer devido a morfologia externa relativamente conservada (SLOWINSKI, 1995; KEOGH, 1999; SILVA *et al.*, 2018), dificultando assim a distinção entre espécies filogeneticamente próximas (MARIN *et al.*, 2013; CERÍACO; BRANCH;

BAUER, 2018; SOARES, 2018).

Contudo, o acesso a dados de sequências de DNA vem auxiliando no processo de identificação desses complexos de espécies crípticas, bem como na posterior descrição de novas espécies (LAOPICHENPONG *et al.*, 2016; JADIN *et al.*, 2019). No entanto, nem sempre os marcadores moleculares, sequenciados ou disponíveis em repositórios digitais, apresentam forte sinal filogenético para acessar as informações no clado ou para delimitação de espécie em alguns grupos (e.g. CHAN *et al.*, 2022), necessitando por vezes de marcadores adicionais e mais informativos.

Além disso, apesar da morfologia relativamente conservada, a maioria das espécies amplamente distribuídas apresentam variações de caracteres, até mesmo morfométricos, ao longo de sua distribuição, visto que condições seletivas e pressões distintas atuam de maneira diferente em cada população local (ENDLER, 1986). Isso pode ocorrer dado a capacidade de um único genótipo produzir diferentes fenótipos em resposta às condições ambientais diversas (WEST-EBERHARD, 1989). Dessa forma, diversas espécies podem apresentar elevados níveis de plasticidade fenotípica em alguns traços de caractere, como tamanho da prole, tamanho corporal, preferência alimentar, etc. (e.g. DE OLIVEIRA; DE FRANÇA; FRANÇA, 2020). Assim, dentro de um determinado táxon a plasticidade fenotípica pode ter um papel maior sobre a variação morfológica dos indivíduos que propriamente a variação genética (SVANBÄCK & EKLÖV, 2006). Essas variações observáveis podem não resultar em diferenças filogenéticas concretas ou mesmo dificultar a compreensão dos limites entre espécies, quando distintas. Desta forma, uma abordagem integrada para acessar a história evolutiva dos táxons e testar os limites de espécies é recomendada.

Compreender e quantificar a diversidade biológica, além de acessar a história evolutiva dos táxons, são alguns dos principais objetivos da sistemática filogenética (AMORIM, 2002). Tradicionalmente, a condução de estudos taxonômicos ocorria por meio da avaliação e classificação das espécies baseadas, majoritariamente, em caracteres morfológicos (e.g. EWING, 1930; BLOW; BANNER, 1966; NICKLE *et al.*, 1981). Contudo, essa forma de execução de taxonomia nem sempre é capaz de acessar a diversidade real de espécies plenamente, em razão das limitações dos dados morfológicos, sendo em alguns casos pouco informativos ou bastante conservados entre as espécies de um mesmo grupo (PADIAL *et al.*, 2010). Devido a isso, atualmente considera-se indicado que as hipóteses de espécies sejam testadas utilizando múltiplas abordagens e dados complementares, concomitantemente (DAYRAT, 2005).

Dessa forma, a taxonomia integrativa surge como proposta promissora para ajudar a elucidar questões taxonômicas complexas. Ela une a avaliação morfológica ao estudo genético e outras abordagens complementares (*i.e.* anatomia hemipeniana, biogeografia, ecologia, fisiologia, etc.) buscando permitir uma melhor resolução e suporte às hipóteses formuladas (PIRES; MARINONI, 2010). Nessa forma de conduzir estudos taxonômicos há integração de mais de uma linha de evidência, uma vez que mais dados, e de abordagens distintas, podem auxiliar a delimitar com maior grau de confiabilidade os grupos e, assim, descrever as espécies (PANTE; SCHOELINCK; PUILANDRE, 2015), principalmente quando envolver complexos de espécies crípticas.

Considerando a grande variabilidade morfológica da espécie (*e.g.* DIXON; WIEST; CEI, 19993) e estudos prévios com base em coalescência multiespécie que apontam a existência de diversidade críptica em *Chironius flavolineatus*, além de algumas dessas populações habitarem centros de endemismo do Ceará (*i.e.* Chapada da Ibiapaba e Chapado do Araripe), o presente trabalho buscou investigar a variação dos caracteres morfológicos, merísticos, anatômicos e de sequências de DNA de *Chironius flavolineatus* a partir de uma abordagem integrativa de taxonomia. Especificamente, objetivou-se (1) testar se seus caracteres diagnósticos são consistentes ao longo de sua distribuição; (2) avaliar a existência de diversidade críptica por meio de uma análise integrada de diferentes fontes de dados e 3) se há necessidade de reformulação taxonômica da população de *C. flavolineatus* do estado do Ceará.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Conjunto de dados

Foram analisados espécimes identificados como *Chironius flavolineatus* e *Chironius sp.* depositados em coleções científicas do: Instituto Vital Brasil - IVB (Niterói-RJ); Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas - MUFAL (Maceió-AL); Museu Nacional do Rio de Janeiro - MNRJ (Rio de Janeiro-RJ); Coleção Zoológica Delta do Parnaíba - CZDP (Parnaíba-PI); Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Ceará - CHUFC (Fortaleza-CE); Coleção Herpetológica da Universidade Federal da Paraíba - CHUFPB (João Pessoa-PB); Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Pernambuco - CHUFPE (Recife-PE); Coleção Herpetológica e Paleontológica da Universidade Federal Rural do Pernambuco - CHPUFRPE (Recife-PE) e Coleção Herpetológica da Universidade

Regional do Cariri - URCA (Crato-CE). Os vouchers dos espécimes encontram-se listados no Apêndice A.

2.1.2 Morfologia e morfometria

Foi adotada a terminologia dos escudos cefálicos de acordo com Peters (1964) e a aferição dos dados morfométricos dos espécimes seguiu o indicado pelos trabalhos de Dixon, Wiest e Cei (1993), bem como Hamdan e Fernandes (2015).

Com relação aos caracteres merísticos, foram caracterizadas e contabilizadas escamas em diversas regiões do corpo dos espécimes, observando principalmente: o número de fileiras de escamas dorsais e de fileiras de escamas dorsais quilhadas ao longo das regiões anterior, mediana e posterior do corpo do espécime; a presença e quantidade de fossetas apicais; número de escamas ventrais e subcaudais. Além disso, foram observados e contabilizados os números de escamas dorsais, ventrais, subcaudais e de escamas craniais (*i.e.* número de infralabiais e supralabiais, pré-oculares, pós-oculares, temporais anteriores e posteriores, occipitais), considerando-se como padrão a observação do lado direito do espécime.

Os caracteres morfométricos corresponderam a medidas de comprimento e largura de regiões do crânio dos espécimes como: largura da cabeça (Lca) (no ponto mais largo); comprimento da cabeça (Cca) (da ponta do focinho até a articulação mandibular quadrada); comprimento horizontal (CHO) e vertical da órbita (CVO); distância entre o rostro e a órbita (DRO); distância entre as narinas (LF); largura ao meio do corpo (LMC) (no ponto mais largo); altura ao meio do corpo (AMC) (no ponto mais alto); comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cauda (CC). Os caracteres CRC e CC foram aferidos utilizando uma fita métrica fixa, estendida sobre uma superfície plana, e esticando o espécime cuidadosamente sobre ela até o 1,0 mm mais próximo, enquanto os demais caracteres foram aferidos através de um paquímetro digital até o 0,01 mm mais próximo.

Por fim, os caracteres qualitativos envolveram principalmente a conformação da placa anal dos espécimes, os padrões de coloração ao longo do corpo do animal, bem como a geometria de escamas cefálicas. Durante a análise dos caracteres envolvendo padrões de coloração, os espécimes foram submergidos em recipientes contendo álcool 70%, a fim de permitir a melhor visualização dos detalhes destes caracteres.

A sexagem dos espécimes foi aferida através de incisão longitudinal na base anterior da região ventral das escamas subcaudais, próximo à placa anal, a fim de identificar a

presença ou ausência do músculo retrator do hemipênis (*retrator pênis magnus*), quando o próprio hemipênis não se encontrava total ou parcialmente evertido.

2.1.3 Preparação e anatomia do hemipênis

No presente trabalho, foi adotado o conceito de espécie a partir da identificação de combinações únicas de caracteres morfológicos, plesiomórficos e apomórficos, (*vide* CRACRAFT, 1983) e de linhagens de metapopulações evoluindo distintas umas das outras (*vide* DE QUEIROZ, 2007). Além disso, foi tolerado ainda certo grau de polimorfismo (5%) dos estados de caracteres entre os representantes das populações, para definir assim as unidades taxonômicas operacionais válidas (*vide* WIENS; SERVEDIO, 2000). Para reforçar a decisão taxonômica sob diferentes fontes de informação (PADIAL *et al.*, 2010), foram consideradas múltiplas linhas de evidências, isto é: observação de variações morfológicas por região geográfica; análises moleculares e filogenéticas; bem como análises estatísticas multivariadas.

Considerou-se as populações de *C. flavolineatus* apontadas por Hamdan *et al.*, 2017, referentes aos Brejos de Altitude do Ceará; Mata Atlântica de terras baixas do Rio Grande do Norte e Paraíba e da Serra das Três Barras em Goiás, aqui referidas como CE; RNPB e GO, respectivamente, bem como as demais ao longo da distribuição nacional (CH) para testar as possíveis diferenças entre as referidas populações. Dessa forma, procedeu-se em busca de variação qualitativas e quantitativas de caracteres morfológicos que indicassem a descontinuidade, ou não, da morfologia entre as populações. Para tal, foram considerados os caracteres descritos para o lectótipo (*vide* HAMDAN; SCALI; FERNANDES, 2014) como base principal para comparação, a fim de distinguir os espécimes analisados do tipo portador do nome de *C. flavolineatus* observado por Jan (1863), posto que não há localidade-tipo específica para possibilitar a comparação com espécimes atuais oriundos da população acessada por ele. Sendo assim, considerou-se como *C. flavolineatus stricto sensu* espécimes que apresentem, principalmente, o seguinte conjunto de caracteres: escamas dorsais em 12-12-8 fileiras para machos e 12-12-10 para fêmeas (*vide* HAMDAN; FERNANDES, 2015), lisas à distância de um comprimento de cabeça desde a região occipital até a porção posterior do corpo; no máximo duas fileiras de escamas dorsais quilhadas na porção média e na porção posterior do corpo; fossetas apicais presentes no pescoço; 145 escamas ventrais; subcaudais divididas e placa cloacal dividida; a cor de fundo dorsal muda gradualmente em direção à cauda; primeiro terço do corpo preto a cinza-escuro; porção média do corpo castanho-escuro,

e último terço do corpo castanho-claro; faixa vertebral amarelada, esmaecendo gradativamente em direção à porção posterior do corpo; faixa vertebral começa logo atrás da cabeça e estende-se até o terço posterior do corpo; a largura da faixa vertebral corresponde ao tamanho de uma escama vertebral; bordas laterais da faixa vertebral mais escuras que as escamas adjacentes, geralmente correspondendo à última fileira de escamas dorsais quilhadas; porção ventral do corpo e cauda homogeneamente branco-creme ou amarelada. Dessa forma, foram analisados 12 caracteres merísticos, 10 morfométricos e 20 qualitativos dos espécimes, referente a morfologia externa.

2.2 Análise de dados

2.2.1 Tratamento dos dados e análises estatísticas

Primeiramente, foram avaliadas a normalidade e homocedasticidade dos valores dos caracteres observados, através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, confirmando essas suposições a partir de um valor de $p > 0,05$ (LEVENE, 1960; SHAPIRO; WILKE, 1965). Em seguida, foram realizadas análises exploratórias básicas e descritivas (*i.e.* média, mediana, desvio padrão, valor máximo e mínimo, etc.) para acessar os padrões característicos das populações utilizando o *software* R versão 4.1.3 (R CORE TEAM, 2018). Os dados referentes à espécimes machos e fêmeas foram tratados distintamente, a fim de observar algum possível dimorfismo sexual ou outras diferenças entre as populações. Ademais, os caracteres referentes à espécimes juvenis não foram analisados estaticamente, objetivando assim excluir o possível viés ontogenético. Segundo Pinto *et al.* (2010), os machos e fêmeas com valores de CRC acima de 507 mm e 606 mm, respectivamente, são considerados sexualmente maduros, dessa forma, utilizou-se essa medida como corte para delimitar o estágio ontogenético dos espécimes.

Primeiramente, todos os dados merísticos sofreram transformação em função de \log_{10} (CLAUDE, 2013; KLINGENBERG, 2016) e tratados através de uma regressão linear em função do CRC, utilizando assim somente os resíduos dessa regressão nas análises estatísticas, a fim de excluir a influência do tamanho dos indivíduos sobre as demais medidas. Foram também, previamente

Para testar e avaliar as possíveis diferenças entre as populações apontadas, realizou-se uma análise de função discriminante (DFA), a fim de analisar se as populações são de fato diferentes entre si e quais variáveis, simultaneamente, são mais explicativas para a

separação (KLEKCA, 1980; SILVA, 2007). Os resultados das classificações foram expressos na forma de uma matriz de confusão com resubstituição, na qual as porcentagens de reconhecimento dos grupos pela análise foram acessadas. As variáveis mais informativas entre as populações foram observadas a partir do coeficiente de discriminação linear resultante da análise.

Por fim, a partir da obtenção das variáveis mais explicativas, tanto para os espécimes machos como para fêmeas, realizou-se uma análise de variância de uma via (ANOVA; $p < 0,05$) para assim avaliar se as características de fato apresentam variação entre as populações (ZAR, 1999).

2.2.1 Genética e filogenia

Para recuperar a posição filogenética de *C. flavolineatus* e suas relações, bem como de suas populações indicadas a novos táxons, foram obtidas nove novas sequências de nucleotídeos do gene mitocondrial 16S (L2510mod - CCG ACT GTT TAM CAA AAA CA; H3056mod - CTC CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT RGG), indicado por TORRES-CARVAJAL *et al.* (2019), a partir de amostras de tecido (fígado) de espécimes previamente identificados como *C. flavolineatus* depositadas na CHUFC e URCA. O DNA foi extraído utilizando o *kit* de extração Qiagen DNeasy. Já a amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizada seguindo o protocolo padrão proposto por Palumbi *et al.* (1991), com volume final de aproximadamente 13 μ L, contendo 5,5 μ L de água deionizada; 1,5 μ L de MgCl₂; 1,5 μ L de *mix* de dNTP; 1,5 μ L do *primer* 16S; 0,3 μ L de Taq DNA Polimerase; 1,5 μ L de tampão 10x (Tris-CL 100mM, KCL 500mM) e 1 μ L do DNA extraído, e reações de amplificação com os seguintes ciclos: 94°C (3 min), 35 \times [94°C (30 seg), 48,6°C (1 min) e 72°C (1 min)], e 72°C (10 min). A fim de verificar a possível ocorrência de contaminação, foram utilizadas amostras de controle negativo. As amplificações positivas foram sequenciadas e posteriormente submetidas ao GenBank. Os produtos da PCR foram analisados em géis de agarose a 1%, através de eletroforese horizontal, e purificados com ExoSAP-IT para remover o *mix* de dNTP, os *primers* remanescentes, bem como DNA de cadeia simples estranhos produzido durante a PCR.

Além das novas sequências processadas, foram obtidas no GenBank e inseridas na filogenia outras sequências referentes a 16 espécies de *Chironius* (e.g. *C. bicarinatus* (Wied-Neuwied, 1820); *C. brazili* Hamdan & Fernandes, 2015; *C. challenger* Kok, 2010; *C. diamantina* Fernandes & Hamdan, 2014; *C. exoletus* (Linnaeus, 1758); *C. flavopictus* (Werner, 1909); *C.*

foveatus Bailey, 1955; *C. fuscus* (Linnaeus, 1758); *C. gouveai* Entiauspe-Neto, Lúcio-Lyra, Koch, Marques-Quintela, Diesel-Abegg & Loebmann, 2020; *C. grandisquamis* (Petes, 1869); *C. laevicollis* (Wied-Neuwied, 1824); *C. leocometapus* Dixon, Wiest & Cei, 1993; *C. maculoventris* Dixon, Wiest & Cei, 1993; *C. monticola* Roze, 1952; *C. multiventris* Schimidt & Walker 1943 e *C. scurrulus* (Wagler, 1824)). Além disso, sequências correspondentes a outros oito gêneros de serpentes da família Colubridae foram utilizadas afim de compor os grupos externos (Apêndice B). Esses foram escolhidos baseados em hipóteses filogenéticas prévias (*vide* HOLLIS, 2006; PYRON; BURBRINK; WIENS, 2013; KLACZKO; MONTINGELLI; ZAHER, 2014; FIGUEROA *et al.*, 2016), correspondendo assim a sete espécimes de gêneros da subfamília Colubrinae (*Dendrophidion* Fitzinger, 1843; *Drymarchon* Fitzinger, 1843; *Drymobius* Fitzinger, 1843; *Drymoluber* Amaral, 1930; *Leptophis* Bell, 1825; *Opheodrys* Fitzinger, 1843 e *Oxybelis* Wagler, 1830) e o gênero *Dipsas* Laurenti, 1768 da subfamília Dipsadinae, utilizado para enraizar a árvore.

2.2.1.1 Alinhamento e análises filogenéticas

As sequências utilizadas no presente estudo foram editadas manualmente utilizando o *software* Mega X (KUMAR *et al.*, 2018), realizando alinhamento inicial com ClustalW (este passo foi repetido a cada ação de corte das porções) e o corte das porções terminais e iniciais das sequências. Por fim, verificou-se a presença de códons inválidos, os quais foram substituídos pelo códon em consenso, ou quando não o havia, substituído por “?”. Posteriormente, todas as sequências foram novamente alinhadas através do *software* MAFFT versão 7 (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019) com todos os parâmetros padrões, mas utilizando o método de refinamento E-INS-i, recomendado para sequências com múltiplos domínios conservados (KATO; ASIMENOS; TOH, 2009).

Posteriormente, utilizando o Mega X, realizou-se análise exploratória para averiguar a distância genética par a par, entre os espécimes das populações indicadas, a partir do método de estimação de variância de Bootstrap com 1.000 replicações e modelo de substituição pela distância-p. A variação da taxa entre os sítios foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 4). De forma exploratória, todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências surgindo a necessidade (opção de exclusão par a par) em uma análise, enquanto em outra realizou-se a exclusão de todos os sítios contendo dados ausentes ou lacunas (opção de deleção completa) (KUMAR *et al.*, 2018). Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências surgindo a

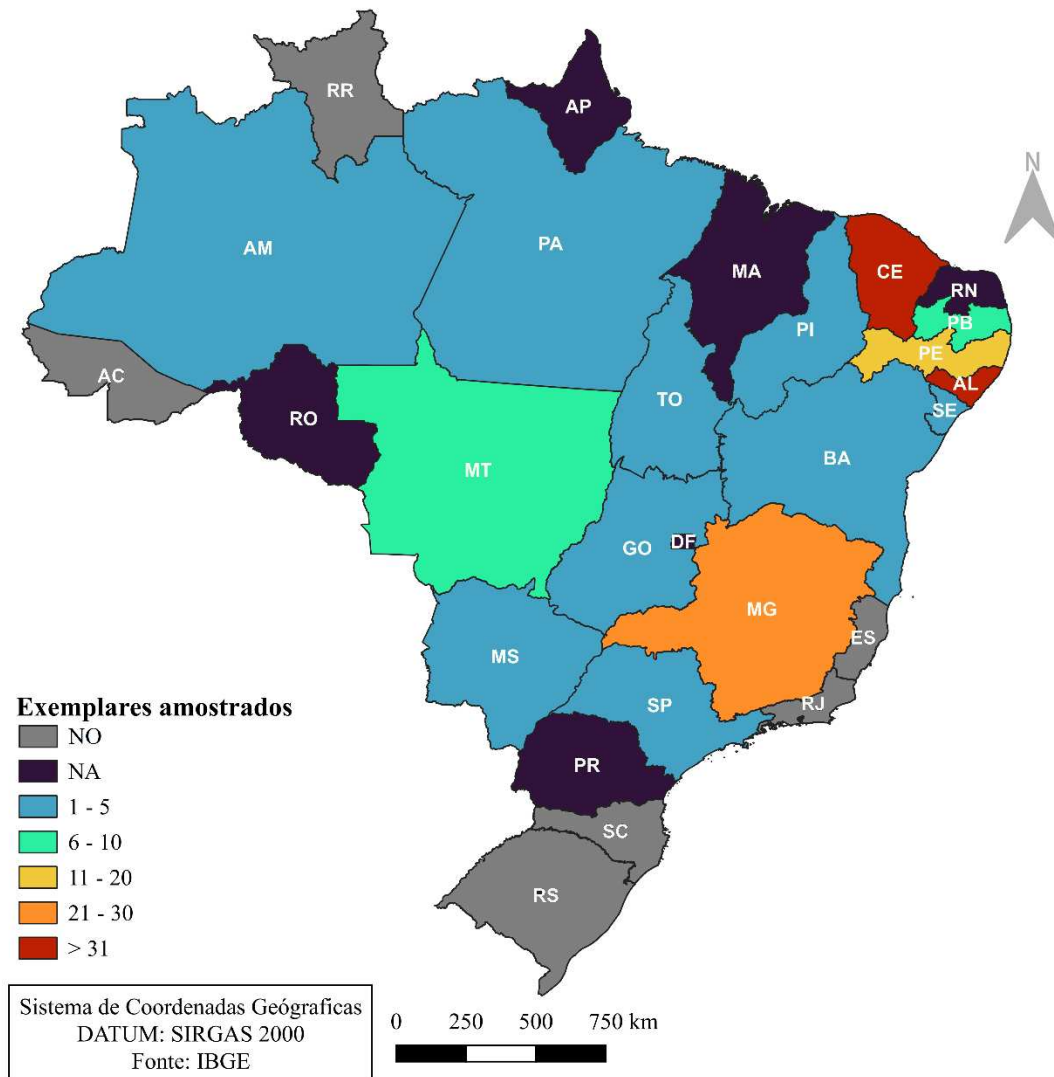
necessidade (opção de exclusão par a par) (KUMAR *et al.*, 2018).

Além disso, utilizou-se o *software* jModelTest (POSADA, 2008), na plataforma CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010), para selecionar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos. Selecionou-se assim o modelo de substituição TIM1+I+G, obtido a partir do Critério de Informação de Akaike Corrigido (AICc). A partir da obtenção deste modelo de substituição, realizou-se então tanto uma análise de inferência bayesiana, utilizando o MrBayes 3.2.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) no CIPRES, como uma análise de máxima verossimilhança através do Mega X, a fim de obter a melhor opção de árvore filogenética para todo o conjunto de dados. A execução da inferência bayesiana foi configurada para 10^7 gerações com amostragem a cada 1.000 gerações, gerando assim 10.000 árvores das quais 1.000 foram descartadas como “queima” durante o processo de execução para a confecção da árvore de consenso. Já a análise de máxima verossimilhança transcorreu testando a filogenia através do método de Bootstrap com 1.000 pseudoreplicações.

3 RESULTADOS

Foram analisados 149 exemplares (machos: 64 e fêmeas: 85) de espécimes identificados como *Chironius flavolineatus*. A amostragem compreendeu espécimes de 16 estados brasileiros (Alagoas: 31, Amazonas: 1, Bahia: 2, Ceará: 34, Goiás: 2, Mato Grosso: 6, Mato Grosso do Sul: 1, Minas Gerais: 27, Pará: 2, Paraíba: 7, Pernambuco: 17, Piauí: 3, São Paulo: 4, Sergipe: 1 e Tocantins: 2) (Apêndice A, Figura 1).

Figura 1 – Mapa de calor destacando as localidades de amostragem dos espécimes analisados de *Chironius flavolineatus*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A coloração gradual indica o número de espécimes obtidos em cada localidade, na qual também inclui locais onde a espécie não ocorre (NO) e não foi amostrada no estudo (NA).

3.1 Caracteres externos

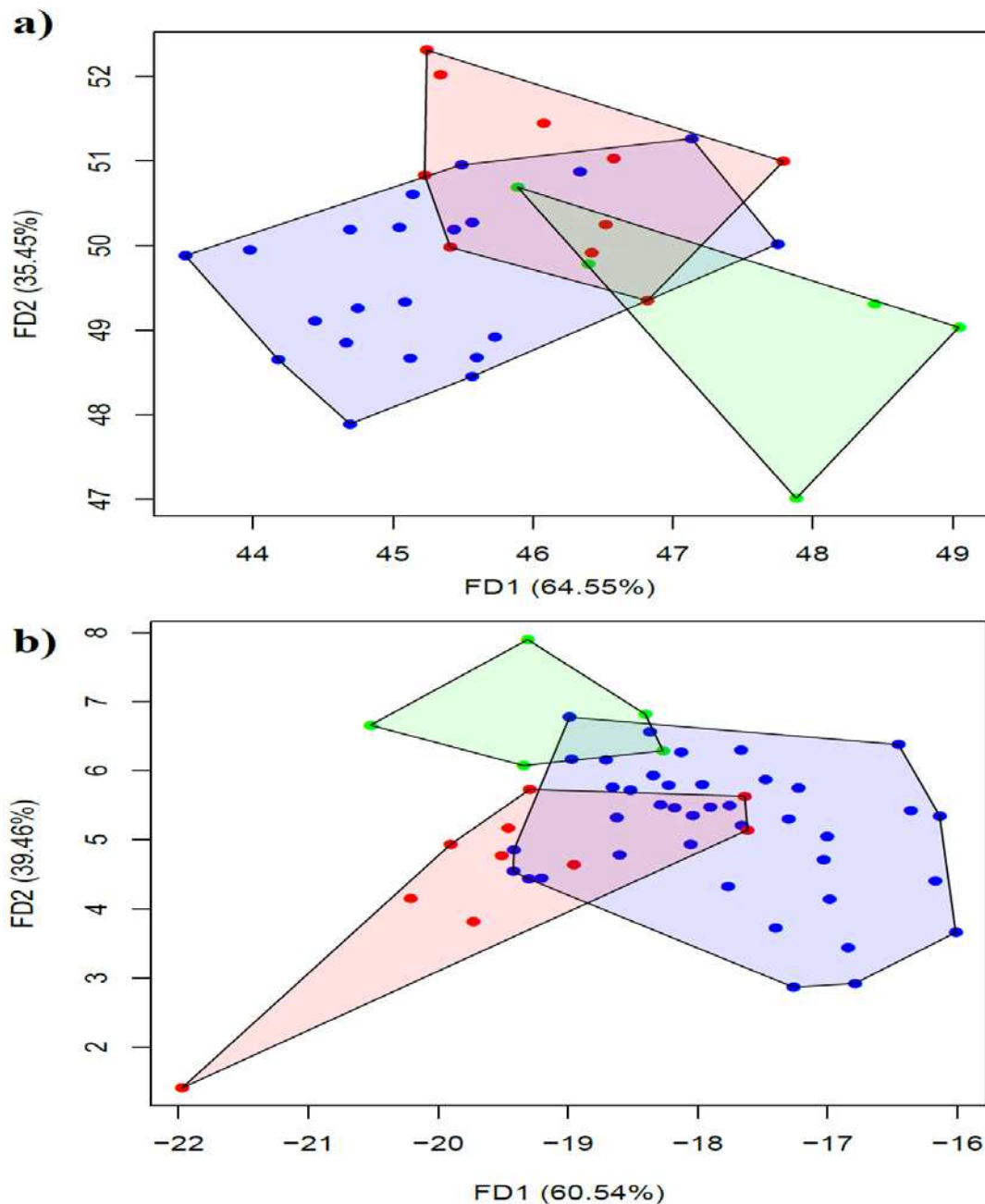
Apesar do acesso a várias coleções herpetológicas representativas do Brasil, espécimes originados de Goiás foram extremamente raros, portanto, no presente trabalho não foram considerados para as análises estatísticas, mas foram observados seus caracteres para compor ao banco de dados e realizou-se as análises filogenéticas com a sequência disponível.

Observou-se que a morfologia entre as populações de *C. flavolineatus* se apresenta conservada, com considerável sobreposição de caracteres, tanto em relação ao padrão de coloração como também em medidas corporais e de contagem (Apêndice C).

Com relação aos machos, obteve-se através da matriz de confusão uma

recuperação de 60% (CE), 85,71% (CH) e 60% (RNPB) dos grupos indicados *a priori*, com acerto global maior que 75%. Como observado pelo resultado da DFA (Figura 2a), alguns caracteres mostraram uma discreta tendência nos grupos, principalmente os referentes ao comprimento rostro cloacal (CRC); comprimento da cauda (CC); comprimento vertical do olho (CVO) e comprimento da cabeça (CCa) (Figura 3).

Figura 2 – Análise de função discriminante (DFA) de espécimes machos (a) e fêmeas (b) de *Chironius flavolineatus*. Polígonos correspondem às populações do: Ceará (vermelho); Mata Atlântica do Rio Grande do Norte e Paraíba (azul) e do restante da distribuição nacional (verde).

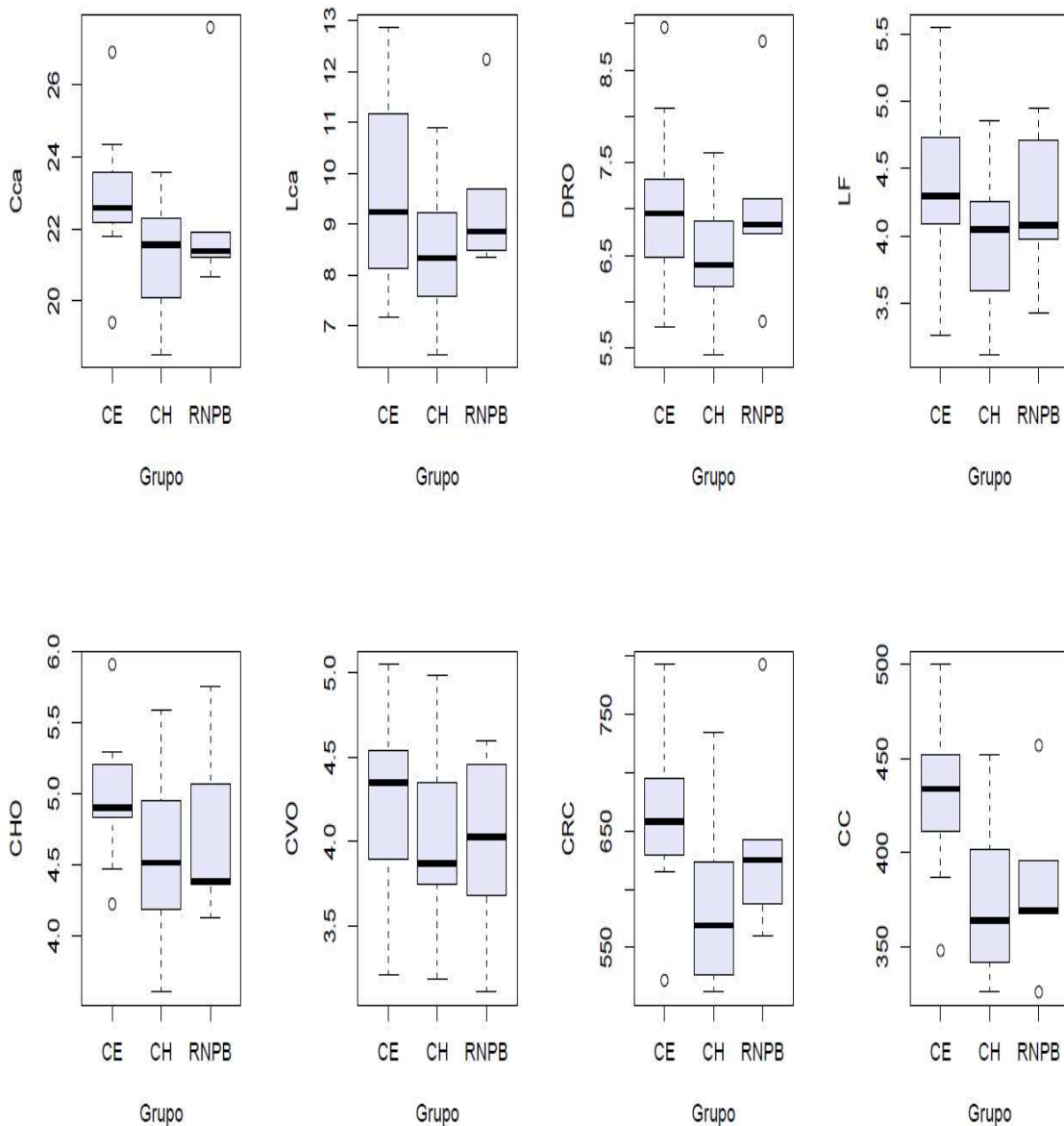


Fonte: Desenvolvido por Antônio Rafael Lima Ramos.

Apesar de não extraídos na DFA, notou-se também durante as análises exploratórias

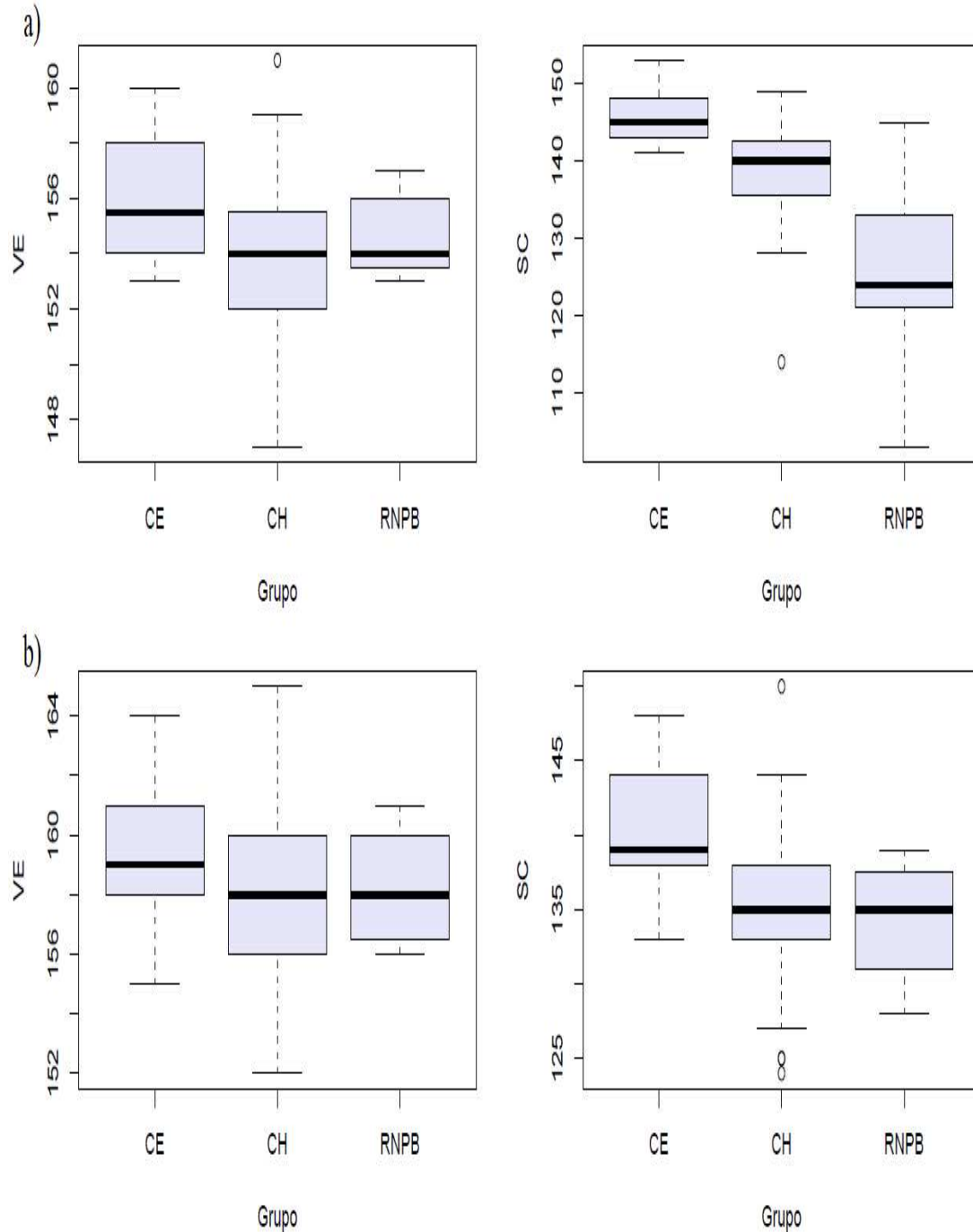
uma pequena distinção, com relação à largura do focinho (LF) e da cabeça (Lca) (Figura 3), bem como no número de escamas subcaudais (Figura 4a). Dentre os quatro caracteres mais explicativos apontados pela DFA, o CVO ($p = 0,36$) não varia de fato entre as populações, mas o CRC ($p = 0,01$) e o CC ($p = 0,007$) mostraram-se significativamente variáveis, enquanto o Cca ($p = 0,06$) foi marginalmente significativo. Dessa forma, nota-se estatisticamente que os machos da população do Ceará têm uma tendência a serem maiores que os das demais populações, principalmente com relação ao valor máximo e medianas de CRC e CC observadas.

Figura 3 – Conjunto de *boxplots* comparando os caracteres morfométricos observados nos machos das populações de *Chironius flavolineatus*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Cca (comprimento da cabeça), Lca (largura da cabeça), DRO (distância rostro-orbital) LF (largura do focinho), CHO (comprimento horizontal do olho), CVO (comprimento vertical do olho), CRC (comprimento rostro-cloacal), CC (comprimento caudal). Grupo CE (Ceará), CH (Distribuição nacional) e RNPB (Rio Grande do Norte-Paraíba).

Figura 4 – Conjunto de *boxplots* comparando a contagem do número de escamas ventrais (VE) e subcaudais (SC), de machos (a) e fêmeas (b), observada entre as populações de *Chironius flavolineatus*.

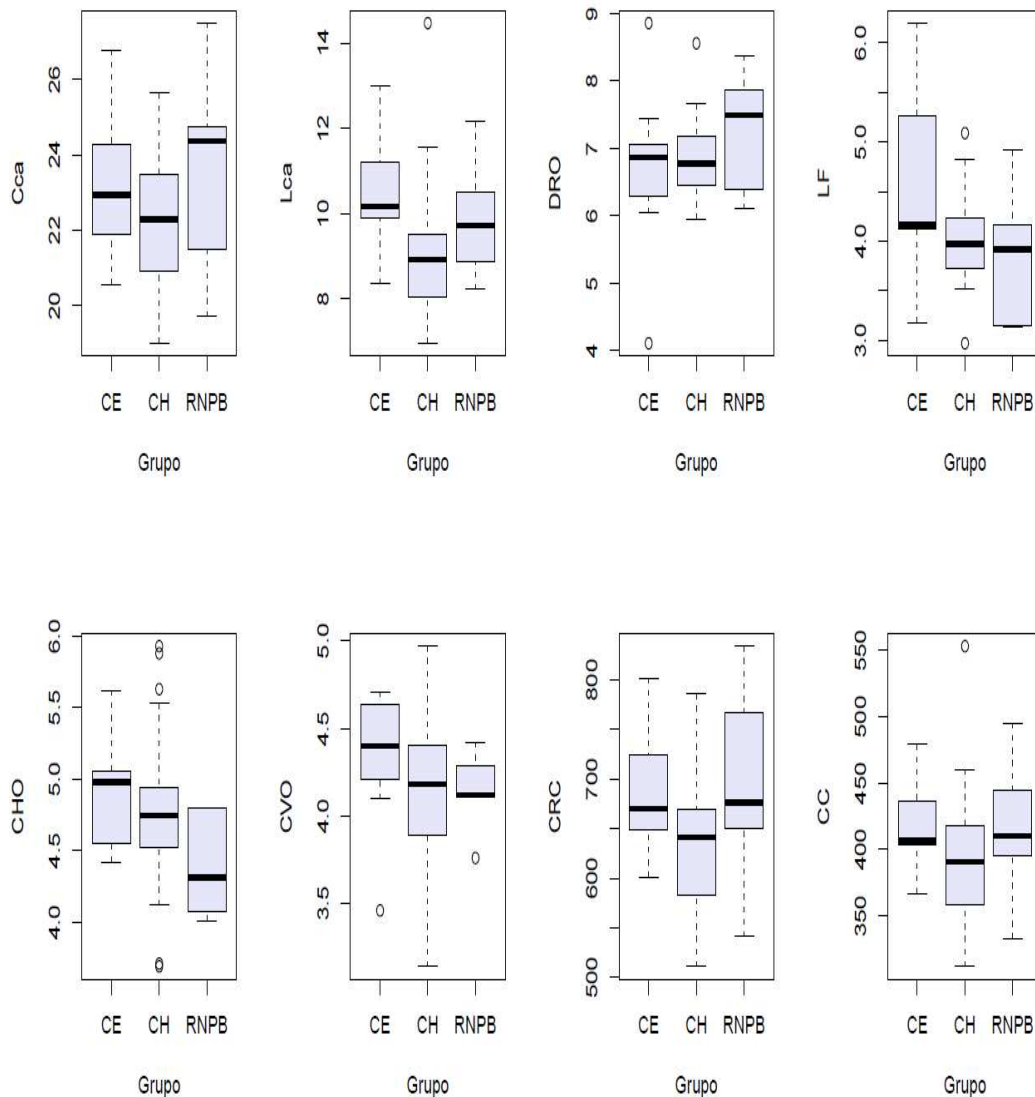


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: VE (número de escamas ventrais) e SC (número de escamas subcaudais). Grupo CE (Ceará), CH (Distribuição nacional) e RNPB (Rio Grande do Norte-Paraíba).

Já com relação às fêmeas, por meio da matriz de confusão houve uma recuperação de uma menor porcentagem com relação as populações CE (50%) e RNPB (40%), mas recuperando quase a totalidade de CH (97,5%), obtendo assim acerto global igual a 83,63%. As fêmeas também apresentaram considerável sobreposição de caracteres entre algumas populações, mas nota-se que não há sobreposição entre CE e CH, apenas de ambas com

RNPB (Figura 2b). A DFA extraiu as variáveis Cca, Lca, distância rostro orbital (DRO) e comprimento horizontal do olho (CHO), como os principais caracteres que poderiam explicar a distinção entre as populações. Além disso, assim como para os machos, observou-se uma ligeira distinção entre as contagens do número de escamas ventrais, mas principalmente de subcaudais (Figura 4b), nas quais as fêmeas possuem maior número dessas escamas que as demais populações. Contudo, apenas Lca ($p = 0,015$) varia entre as populações, sendo os demais (Cca, $p = 0,09$; DRO, $p = 0,41$ e CHO, $p = 0,12$) na verdade similares entre as populações. Dessa forma, as fêmeas de CE possuem cabeças ligeiramente mais largas (Lca) que das demais populações avaliadas (Figura 5).

Figura 5 – Conjunto de *boxplots* comparando os caracteres morfométricos observados nas fêmeas das populações de *Chironius flavolineatus*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor. Legenda: Cca (comprimento da cabeça), Lca (largura da cabeça), DRO (distância rostro-orbital) LF (largura do focinho), CHO (comprimento horizontal do olho), CVO (comprimento vertical do olho), CRC (comprimento rostro-cloacal), CC (comprimento caudal). Grupo CE (Ceará), CH (Distribuição nacional) e RNPB (Rio Grande do Norte-Paraíba).

A análise de variáveis qualitativas revelou estados de caractere em certos indivíduos, não citados nas revisões taxonômicas que *C. flavolineatus* recebeu ao longo dos anos, muito menos evidenciados em sua descrição. O mais evidente é a presença de uma pequena porção enegrecida, oblíqua, na borda de algumas escamas da cauda (Figura 6), aqui referido como “linha preta na região paraventral das escamas caudais” (LPPVSC). Esse caractere apresentou-se como multiestado, podendo estar ausente ou ser encontrado como: discreto (pouco visível e em poucas escamas) e marcado (bastante evidente e presente em várias escamas). É presente em proporções similares tanto em machos como em fêmeas em cada população e também não aparenta haver variação ontogenética, sendo presente mesmo em juvenis e podendo se apresentar também em qualquer um dos estados citados. Apesar da grande sobreposição dos caracteres quantitativos, a presença da LPPVSC demonstrou uma possível tendência de estruturação entre as populações. No CE a maior parte dos indivíduos (78%) apresenta esse caractere em algum estado (i.e. discreto ou marcado), sendo mais frequentemente observado o estado “marcado”, enquanto que os espécimes de CH e RNPB o apresentam menos frequentemente, em 35% e 18% dos indivíduos, respectivamente (Tabela 1).

Figura 6 – Linha preta na região paraventral das escamas caudais (LPPVSC) de um espécime de *Chironius flavolineatus* (URCA12026) da população do estado do Ceará (estado de caractere considerado “marcado”). Em azul: escala inserida com proporção do comprimento em milímetros.



Fonte: Imagem produzida por E. F. F. de Carvalho. Nota: Desenvolvida através de estereomicroscópio adaptado para entrada de câmera para melhor observação dos detalhes, mas o caractere pode ser observado a olho nu.

Tabela 1 – Frequência do caractere Linha Preta na região Paraventral das escamas Caudais (LPPVSC) entre as populações de *Chironius flavolineatus*.

	CE	CH	RNPB
Ausente	22%	65%	82%
Discreto	31%	23%	18%
Marcado	47%	12%	0%

Fonte: Dados da pesquisa.

Outros caracteres qualitativos merecem destaque, não pela sua possibilidade de criar agrupamentos, mas novamente pela sua ausência em trabalhos anteriores. Um deles é referente a uma despigmentação característica presente nas bordas centrais das escamas dorsais da faixa vertebral, formando um “ziguezague” de coloração esbranquiçada (FVZZ) (Figura 7), sendo presente na grande maioria dos indivíduos entre todas as populações (>80% dos espécimes). Além disso, há a presença de uma pigmentação diferenciada da cor de fundo do ventre sob a borda posterior das escamas ventrais (PSV), podendo ser observada ao

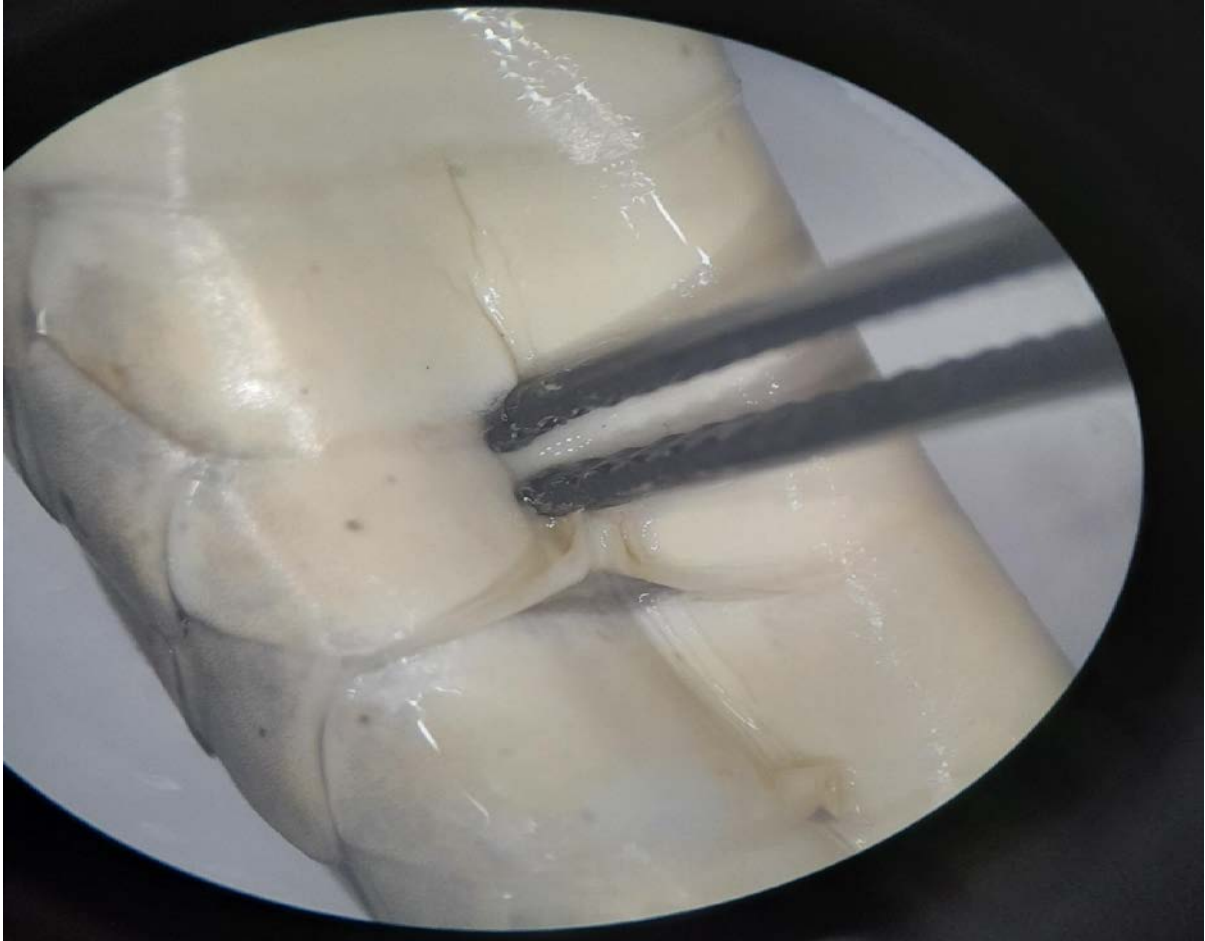
suspender a borda. Observou-se essa pigmentação variando entre os estados: esbranquiçada (30%); acinzentada (21%) e preta (49%) (Figura 8).

Figura 7 – Despigmentação característica e marcada, em “ziguezague”, na borda central das escamas dorsais presentes na faixa vertebral de espécimes de *Chironius flavolineatus* (MNRJ 17771).



Fonte: Desenvolvido pelo autor. Nota: Desenvolvida em lupa de automontagem.

Figura 8 – Pigmentação de fundo sob a borda das escamas ventrais de espécime de *Chironius flavolineatus* com estado de caráter definido como “pigmentado em preto” (MNRJ14853).



Fonte: Desenvolvido pelo autor. Nota: Desenvolvida através de estereomicroscópio, mas o caractere pode ser observado a olho nu.

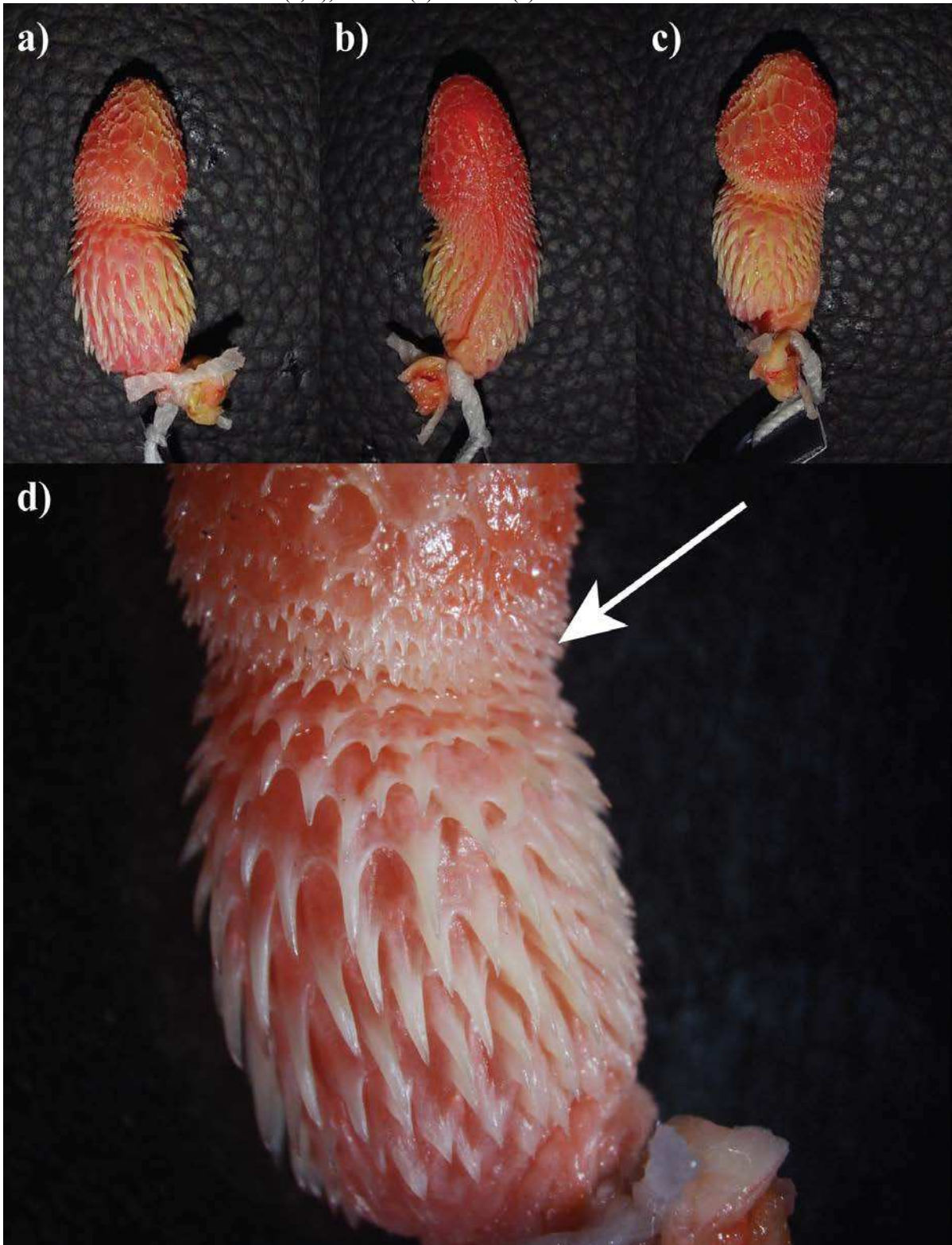
3.2 Hemipênis

Foram preparados 11 hemipênis adicionais de espécimes identificados como *Chironius flavolineatus*, oriundos do Ceará (i.e. CE); Piauí; Alagoas; Pernambuco e Minas Gerais (i.e. CH). Esses órgãos foram comparados entre si, assim como com a descrição apresentada na revisão da espécie (*vide* Hamdan; Fernandes, 2015), a qual analisaram sete hemipênis, oriundos da Bahia; Mato Grosso e Sergipe.

O exame do órgão revelou características distintas das descritas previamente para a espécie. Contudo, a amostragem mais representativa dos órgãos de mesma localidade correspondeu a de exemplares do estado de Ceará, não havendo disponíveis órgãos de espécimes dos grupos RNPB, CH e GO. Portanto, limitar-se-á a descrever o padrão observado nos hemipênis dos espécimes da população do Ceará, comparando-os com o padrão apresentado por Handam e Fernandes (2015) e com os demais órgãos preparados, pertencentes ao grupo CH (estados de

caráter em parêntese), sendo este um: hemipênis unilobado, cilíndrico e unicaliculado, com cálices espinulados e bem desenvolvidos na porção apical. Porção medial do hemipênis com região de constrição marcadamente coberta por espínulos (Figura 9d) separando os cálices do ápice dos espinhos abaixo da região de constrição no lado assulcado (vs. região de constrição sem espínulos separando os cálices do ápice dos espinhos abaixo da região de constrição no lado assulcado). Espinhos curvos de médio a grande, cobrindo os lados laterais e assulcados, sendo estes também compridos e finos (vs. espinhos compridos, ou curtos, e grossos); e espínulos cobrindo o lado sulcado do órgão. Sulco espermático simples, centrolinear e limitado por espínulos ao longo de sua extensão. Sulco espermático posicionado mais lateralmente na porção basal do hemipênis, tornando-se mais central a partir do final do terço medial do hemipênis (vs. sulco espermático tornando-se mais central a partir do final do terço proximal do hemipênis). Em vista lateral, sulco espermático situado na face côncava do órgão. Porção basal do hemipênis com poucos espínulos distribuídos irregularmente.

Figura 9 – Hemipênis de exemplar de *Chironius flavolineatus* da população do Ceará (URCA12023), evidenciando os lados assulcado (a, d), sulcado (b) e lateral (c).



Fonte: Desenvolvido pelo autor. Legenda: Seta branca indica a região medial de constrição do hemipênis marcadamente coberta por espinulos.

3.3 Análises evolutivas

No presente trabalho buscou-se gerar novas sequências genéticas para a espécie, obtiveram-se duas inéditas para a Bahia, além de duas novas originadas do Rio Grande do Norte e outra para o Ceará, totalizando nove novas sequências (Apêndice 2).

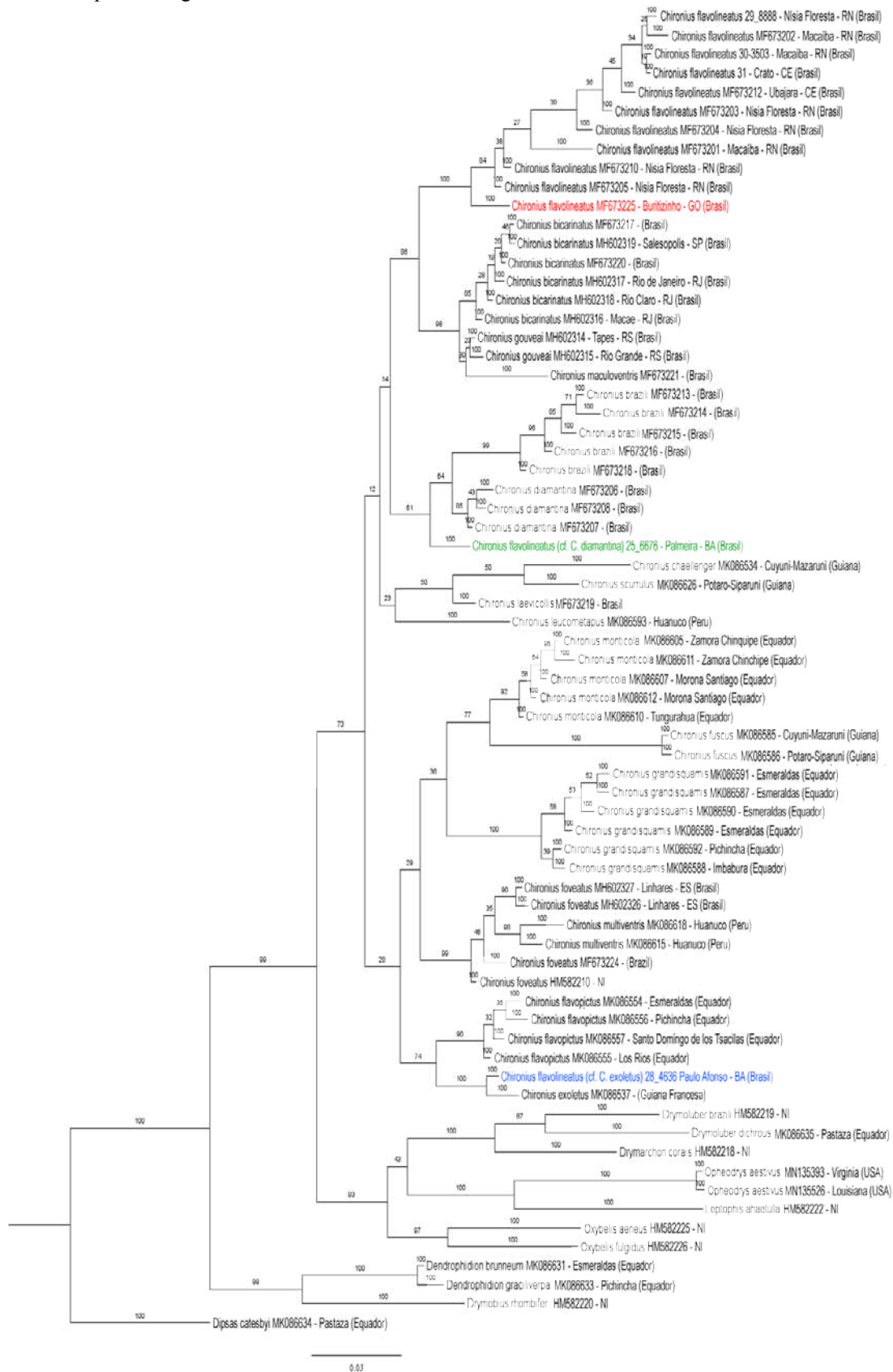
A análise de distância genética com o gene 16S revelou elevada similaridade genética entre as amostras das diferentes espécies candidatas. Da mesma forma, nenhum clado com elevado valor de suporte com estrutura geográfica nas regiões biogeográficas estudadas, seja por inferência bayesiana ou análise de máxima verossimilhança, foi recuperado. A exceção foi a amostra de Goiás, que foi recuperada como uma linhagem distinta e com alto suporte em ambas as análises (Figura 10 e 11).

Com relação à distância genética, as indicadas populações CE e RNPB demonstraram-se muito próximas geneticamente entre si, de acordo com o método de deleção par a par (no máximo 1,52%). Contudo, pelo método de deleção completa, não há nenhuma diferença genética resgatada entre essas duas populações. Já com relação a população de Goiás (GO), em ambos os métodos ela aparenta estar mais distante geneticamente das populações do CE e RNPB, sendo a maior distância resgatada pelo método de deleção completa (2,82%).

Esse resultado é observado também a partir da inferência bayesiana e da análise de máxima verossimilhança, que apesar de gerarem árvores com topografias ligeiramente diferentes (em detrimento das diferenças intrínsecas as duas análises), ambas resgataram a população indicada para GO como um clado irmão do clado CE-RNPB (a partir de agora referido dessa forma) (Figura 10 e 11).

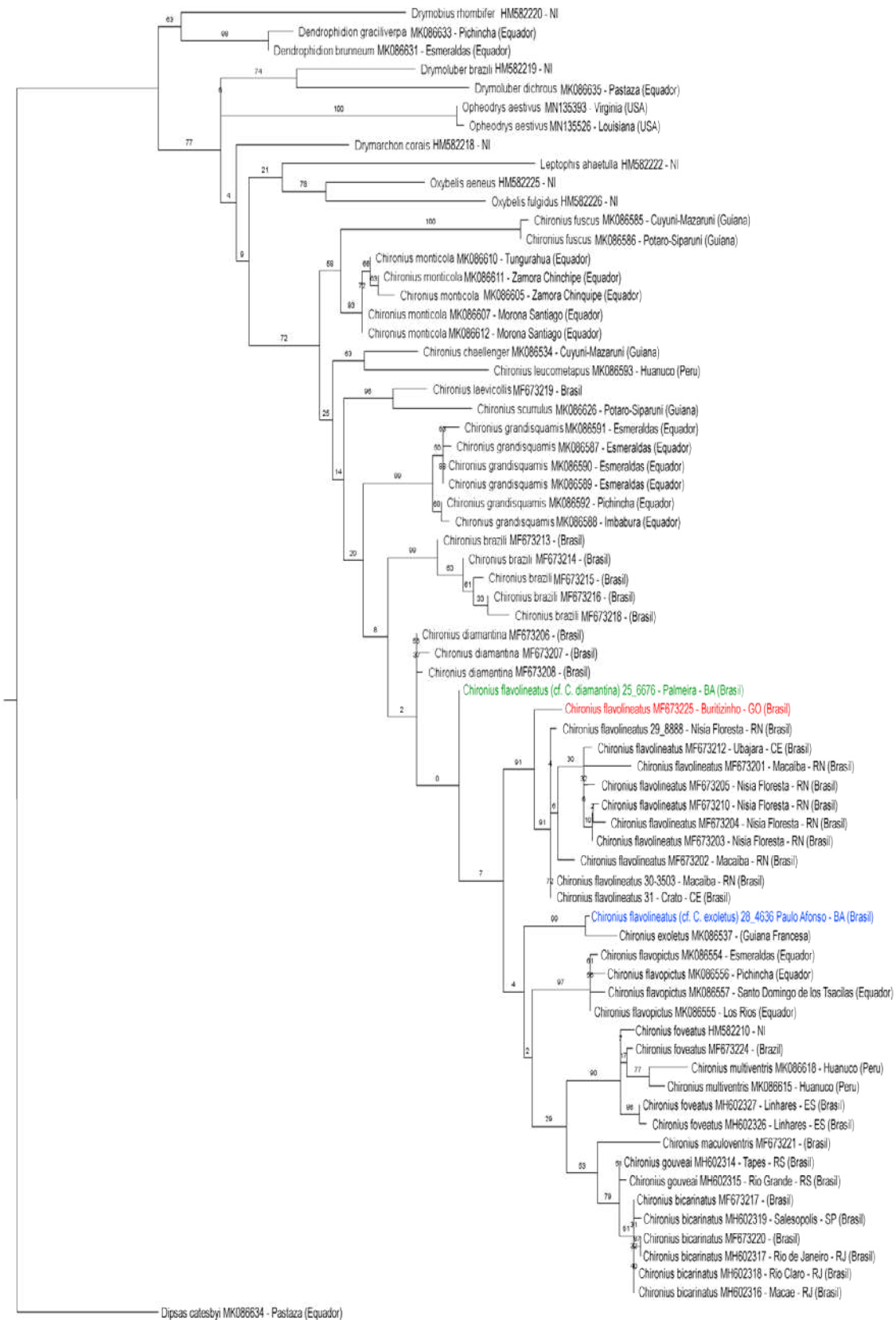
Além disso, todas as análises apontaram dois espécimes da Bahia, identificados *a priori* como *C. flavolineatus*, agrupados como irmãos de *C. diamantina* (exemplar 25_6676) e *C. exoletus* (28_4636).

Figura 10 – Árvore gerada a partir de inferência bayesiana (Mr Bayes), representando a relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Chironius*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 11 – Árvore confeccionada a partir do método de máxima verossimilhança (ML) representando as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Chironius*.



4 DISCUSSÃO

Apesar de ser o segundo maior grupo em riqueza de espécies dentre os Squamata (PYRON; BURBRINK; WIENS, 2013; UETZ *et al.*, 2023), a morfologia externa das serpentes é relativamente conservada entre os grupos (SLOWINSKI, 1995; KEOGH, 1999; SILVA *et al.*, 2018). Ela é influenciada consideravelmente pela similaridade ecológica, visto que diversas espécies exploram o hábitat de forma similar, tendo assim atributos de história natural também similares (*e.g.* FRANÇA *et al.*, 2008). Entretanto, esse conservadorismo morfológico dificulta a distinção entre espécies de serpentes filogeneticamente próximas (MARIN *et al.*, 2013; CERÍACO; BRANCH; BAUER, 2018; SOARES, 2018), o que parece ser o caso para diversas espécies dentro do gênero *Chironius*, dado o extensivo número de revisões taxonômicas, novas espécies descritas e complexos de espécies apontados (*e.g.* DIXON; WIEST; CEI, 1993; FERNANDES; HAMDAN, 2014; HAMDAN; FERNANDES, 2015; TORRES-CARVAJAL *et al.*, 2019; ENTIAUSPE-NETO *et al.*, 2020).

Isso também se reflete em *C. flavolineatus*, visto que os espécimes entre as populações apresentaram forte sobreposição de vários caracteres. Apesar disso, foi observada variação estatisticamente significativa, de certas medidas morfométricas e de folidose, entre a população CE e as demais populações de *C. flavolineatus*. Nos espécimes machos, essa diferenciação foi mais evidente, enquanto que nas fêmeas se apresentou menos claramente definida. Esse achado mostra-se semelhante a estudos taxonômicos anteriores envolvendo espécies do complexo *Bothrops atrox* (*e.g.* WÜSTER, 1996), no qual os machos apresentaram também variação morfológica mais consistente que as fêmeas.

Outros achados referentes à morfologia também merecem destaque, como a identificação e descrição de três características morfológicas presentes em vários indivíduos dentro das populações de *C. flavolineatus*, sendo dois polimórficos (*i.e.* LPPVSC e PSV) e outro, aparentemente, mais homogêneo entre as populações (FVZZ). Os caracteres polimórficos mostram-se interessante e promissores, visto que alinhados a novos estudos moleculares, podem trazer novas informações sobre a história evolutiva e dados sobre variabilidade intra e interespecíficas inéditas do grupo, uma vez que diferenças nas frequências de caracteres mais variáveis também podem fornecer evidências importantes para a delimitação de espécies (WIENS; SERVEDIO, 2000). Principalmente no que se refere a LPPVSC, visto que há uma possível tendência de variação diferencial entre as frequências desse caractere entre as populações indicadas, em destaque para a população do estado do Ceará, a qual o apresentou consideravelmente mais frequente em nossa amostragem. Dessa

forma, refletindo um potencial sinal taxonômico.

Outra questão relevante em relação a LPPVSC é que analisando o trabalho de Dixon, Wiest e Cei (1993), notou-se que os autores atrelaram à *C. flavolineatus* uma característica que se assemelha a LPPVSC e outra que não foi encontrada em nenhum espécime examinado:

[...] escamas dorsais na parte posterior do corpo e cauda às vezes com bordas pretas; [continua] em alguns indivíduos as pontas externas das ventrais e subcaudais são finamente contornadas em preto e uma tênue linha em zigzag é formada na parte inferior da cauda a partir do preto das bordas mediais das subcaudais. (DIXON; WIEST; CEI, 1993, p. 109).

Hamdan e Fernandes (2015, p. 116) também notaram essa incongruência, pelo menos no que tange a linha tênue em zigzag na borda medial das escamas subcaudais (aqui referido como “Caráter 2”). Eles a desvincularam da variação descrita para *C. flavolineatus*, atrelando então à *C. brazili* embasados inclusive pelo acesso à alguns exemplares incluídos no trabalho dos referidos autores (e.g. MZUSP 2438, 3853–55). Contudo, a característica das bordas pretas na parte posterior do corpo e da cauda (aqui referido como “Caráter 1”) ainda permaneceria vinculada à *C. flavolineatus*. Apesar do Caráter 1 se assemelhar com a descrição de LPPVSC aqui apresentada, não é possível tratar-se dessa característica, posto que estão presentes única e exclusivamente na cauda, e não na parte posterior do corpo e cauda como apontado por Dixon, Wiest e Cei (1993). Portanto, propõem-se a desvinculação desse caractere da variação morfológica possível de *C. flavolineatus*. Dessa forma, é válido o acesso futuro a esses exemplares e outros não acessados por Hamdan e Fernandes (2015) a fim de verificar a identidade do portador dessa característica.

A morfologia dos hemipênis de indivíduos oriundos do Ceará também se apresentou como outro achado relevante. Notou-se que há variação em relação a presença marcante de espínulos na região de constrição do hemipênis, na face assulcada, e do sulco espermático alinhando-se ao centro apenas no final do terço medial. Esse conjunto de características foi algo apenas notado nos hemipênis dos espécimes do Ceará. Isso também o diferencia do hemipênis descrito por Hamdan e Fernandes (2015), na revisão de *C. flavolineatus*, uma vez que os hemipênis analisados por eles corresponderam a espécimes da Bahia, Mato Grosso e Sergipe (i.e. CH). O referido conjunto de características hemipenianas pode vir a refletir um padrão característico à população do Ceará, sendo assim necessário ampliar a amostragem de hemipênis para observar se o padrão se sustenta ou se, então,

corresponde à parte da variação da espécie como um todo. Essas duas características se assemelham bastante com as presentes em *C. diamantina* (vide FERNANDES; HAMDAN, 2014, p. 570), sendo um achado inesperado, dado o longo tempo de separação da linhagem que originou as duas espécies (i.e. há aproximadamente 12 milhões de anos) (HAMDAN *et al.*, 2017). Contudo, observamos que a distância genética entre *C. flavolineatus* e *C. diamantina* (3,62%) é consideravelmente menor que a distância entre *C. flavolineatus* e *C. brazili* (5,64%). Sendo assim, essas duas espécies, de fato, estão mais proximamente relacionadas de alguma forma. Desse modo, a anatomia hemipeniana pode trazer informações válidas a serem estudadas e assim auxiliar a compreender melhor a história evolutiva dessas espécies.

As análises evolutivas resgataram hipóteses similares à apresentada por Hamdan *et al.* (2017), de fato apontando a população GO como filogeneticamente distinta de CE-RNPB, considerando tanto a distância genética como a topologia das árvores geradas. É válido destacar que a distância genética entre GO e CE-RNPB foi estimada em 2,82%, sendo até maior que a distância genética entre *C. brazili* e *C. diamantina* (2,01%), espécies irmãs e com caracteres diagnósticos evidentemente distintos. O tempo estimado em que a linhagem de GO começou a ser separada de CE-RNPB também é próximo ao período de separação entre *C. brazil* e *C. diamantina* (HAMDAN *et al.*, 2017), todos no Zanciano há aproximadamente cinco milhões de anos, explicando assim também a distância genética relativamente semelhante entre os clados. Além disso, o tempo de especiação entre as duas linhagens de *C. exoletus* foi apontado de ter ocorrido no Piacenziano (3,02 milhões de anos), sendo um complexo de espécies crípticas também identificado e reforçado por outros autores (e.g. TORRES-CARVAJAL *et al.*, 2019). Dessa forma, comparativamente, o tempo de separação é plausível para ocorrer especiação entre essas linhagens do complexo *C. flavolineatus*. Contudo, durante este estudo, espécimes oriundos de Goiás foram extremamente escassos, sendo necessária a avaliação de mais exemplares para possibilitar inferir apropriadamente sobre a variação morfológica desta população, alinhada com a inferência genética.

Também se faz necessária uma maior e mais representativa amostragem a fim de acessar com maior precisão a história evolutiva e os limites específicos das populações de *C. flavolineatus*, principalmente de amostras de exemplares pertencentes aos grupos GO e CH, que foram limitas e ausentes, respectivamente. Como exemplo da ainda baixa representatividade, as sequências de DNA da espécie disponíveis no *GenBank* procedem somente do Rio Grande do Norte, Ceará e Goiás, representando assim apenas uma reduzida parcela da diversidade genética da espécie. Um tamanho amostral reduzido pode, por vezes,

levar a vieses de resultados em detrimento da distância geográfica entre os grupos analisados (CARSTENS *et al.*, 2013). Dessa forma, a obtenção de novas sequências genéticas pode auxiliar a elucidar melhor as relações entre os táxons.

Mesmo tendo sido obtidas novas amostras de tecidos, de espécimes de demais localidades que as citadas anteriormente, algumas sequências de DNA geradas não se mostraram adequadamente informativas (*i.e.* 25_6626 e 28_4636). No caso dessas duas sequências, ambas são oriundas de espécimes da Bahia e mostraram maior semelhança com outras espécies congêneres (*i.e.* *C. exoletus* e *C. diamantina*). Há possibilidade de se tratar de erro de identificação, posto que espécies do gênero *Chironius*, com certa similaridade de características, podem ser acidentalmente confundidas quando não avaliadas minuciosamente (B. F. Guilhon, observação pessoal, 2021; 2022). Com relação ao espécime 25_6626 é bem provável que corresponda de fato à *C. diamantina*, pois inclusive é oriundo da localidade tipo da espécie (Palmeira - BA) (FERNANDES; HAMDAN, 2014), mas 28_4636 ainda precisa ser acessado para confirmar devidamente a sua identificação. Contudo, o gene 16S, isoladamente, pode apresentar-se também como pouco informativo para identificação a nível de espécie em certos casos (SOERGEL *et al.*, 2012). Ele é 2,5 vezes menos variável que os outros genes (*i.e.* Cytb e CO1), tornando assim seu poder discriminatório menor e possibilitando a observação de similaridades entre espécies distintas (NICOLAS *et al.*, 2012). Dessa forma, torna-se possível a interpretação de seu baixo sinal filogenético para a compreensão das relações evolutivas entre as espécies de *Chironius*.

Diante do exposto, referente aos achados morfológicos e moleculares, considerou-se a amostragem ainda insuficiente para propor e conduzir a descrição de uma nova espécie com segurança. Como observou-se baixa distância genética entre as populações analisadas, apesar da população do estado do Ceará apresentar caracteres que tendem à uma diferenciação com as demais populações, essa diferença pode refletir à um padrão geográfico característico dado a plasticidade fenotípica da espécie e a sua adaptação local. Portanto, é recomendado e necessário ter cautela para não aumentar a diversidade alfa do grupo sem bases firmes para reforçar a proposição, mantendo dessa forma somente o estado de espécies candidatas, necessitando ainda de maiores estudos e amostragens.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho resgatou parcialmente a hipótese filogenética mais recente apresentada para o grupo. Foram apresentadas novas características quantitativas, com

caracteres polimórficos promissores para comparação entre as populações, alinhada à ampliação da amostragem genética. Foram geradas novas sequências e outras inéditas estão para serem disponibilizadas, contribuindo assim com futuros trabalhos para compreender de forma mais precisa as relações filogenéticas deste complexo de espécies. Por fim, foi verificada a presença de características distintas com relação à morfologia do hemipênis, principalmente para os espécimes do estado do Ceará, além de uma similaridade com características presentes em *Chironius diamantina*. Demonstrando, dessa forma, que o complexo *Chironius flavolineatus* possui um amplo espectro de variação, apresentando ainda características não observadas em revisões anteriores. Por fim, apesar de caracteres morfométricos, morfologia hemipeniana e de folidose das subcaudais indicarem sinal taxonômico, considerou-se a amostragem ainda limitada. Portanto, adotou-se parcimônia, optando por não prosseguir com ato nomenclatural novo, mantendo, até o momento, o nome *C. flavolineatus* para a população do estado do Ceará.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, D. D. S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Holos, 2002, 156 p.
- BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.
- BLOW, W. H.; BANNER, F. T. The morphology, taxonomy and biostratigraphy of *Globorotalia barisanensis* LeRoy, *Globorotalia fohsi* Cushman and Ellisor, and related taxa. **Micropaleontology**, v. 12, n. 3, p. 286-302, 1966.
- CARSTENS, B. C. *et al.* How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369-4383, 2013.
- CERÍACO, L. M. P.; BRANCH, W. R.; BAUER, A. M. A new species of African snake-eyed skink (Scincidae: *Panaspis*) from central and northern Namibia. **Zootaxa**, v. 4527, n. 1, p. 140-150, 2018.
- CHAN, Abigail Hui En *et al.* The potential use of mitochondrial ribosomal genes (12S and 16S) in DNA barcoding and phylogenetic analysis of trematodes. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 104, 2022.
- CLAUDE, M. Log-shape ratios, Procrustes superimposition, elliptic Fourier analysis: Three worked examples in R. **Hystrix**, v. 24, n. 1, p. 94-102, 2013.
- CRACRAFT, J. Species Concepts and Speciation Analysis. *In*: JOHNSTON, R. F. (Ed.). **Current Ornithology**. New York, NY: Plenum Press, 1983. p. 159-187.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407-415, 2005.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.
- DE OLIVEIRA, F. A.; DE FRANÇA, R. C.; FRANÇA, F. G. R. Geographical ecology of *Tantilla melanocephala* (Squamata: Serpentes: Colubridae) in a Neotropical region: a comparison of northeastern Atlantic Forest and Caatinga populations. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 57, n. 2, p. 111-120, 2020. doi: <https://doi.org/10.1080/01650521.2020.1817680>.
- DIXON, J. R.; WIEST, J. A. J.; CEI, J. M. **Revision of the Neotropical Snake Genus *Chironius* Fitzinger (Serpentes, Colubridae). Monografie XIII**. Torino, Italy: Museo Regionale di Scienze Naturali, 1993, 279 p.
- DOMINGOS, F. M. C. B. *et al.* In the shadows: Phylogenomics and coalescent species delimitation unveil cryptic diversity in a Cerrado endemic lizard (Squamata: *Tropidurus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 107, p. 455-465, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.009>.

- ENDLER, J. A. **Natural selection in the wild**. 1. ed. New Jersey, USA. Princeton University Press, 1986, 354 p.
- ENTIAUSPE-NETO, O. M. *et al.* Taxonomic Revision of *Chironius bicarinatus* (Wied 1820) (Serpentes: Colubridae), with Description of a New Species. **Herpetological Monographs**, v. 34, n. 1, p. 98-115, 2020.
- EWING, H. E. The taxonomy and host relationships of the biting lice of the genera *Dennyus* and *Eureum*, including the descriptions of a new genus, subgenus, and four new species. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 77, p. 1-16, 1930.
- FERNANDES, D. S.; HAMDAN, B. A new species of *Chironius* Fitzinger, 1826 from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Serpentes: Colubridae). **Zootaxa**, v. 3881, n. 6, p. 563-575, 2014.
- FIGUEROA, A. *et al.* A species-level phylogeny of extant snakes with description of a new colubrid subfamily and genus. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 31, 2016.
- FOUQUET, A. *et al.* From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 2, p. 547-561, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.07.012>.
- FRANÇA, F. G. R. *et al.* Phylogeny and ecology determine morphological structure in a snake assemblage in the central Brazilian Cerrado. **Copeia**, n. 1, p. 23-38, 2008.
- FUNK, W. C.; CAMINER, M.; RON, S. R. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, p. 1806-1814, 2012.
- GRABOSKI, R. *et al.* Revealing the cryptic diversity of the widespread and poorly known South American blind snake genus *Amerotyphlops* (Typhlopidae: Scolecophidia) through integrative taxonomy. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 197, n. 3, p. 719-751, 2023.
- HAMDAN, B. *et al.* Evolutionary analysis of *Chironius* snakes unveils cryptic diversity and provides clues to diversification in the Neotropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 116, p. 108-119, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.08.004>.
- HAMDAN, B.; FERNANDES, D. S. Taxonomic revision of *Chironius flavolineatus* (Jan, 1863) with description of a new species (Serpentes: Colubridae). **Zootaxa**, v. 4012, n. 1, p. 97-119, 2015.
- HAMDAN, B.; SCALI, S.; FERNANDES, D. S. On the identity of *Chironius flavolineatus* (Serpentes: Colubridae). **Zootaxa**, v. 3794, n. 1, p. 134-142, 2014.
- HOLLIS, J. L. Phylogenetics of the genus *Chironius* Fitzinger, 1826 (Serpentes, Colubridae) based on morphology. **Herpetologica**, v. 62, n. 4, p. 435-453, 2006.
- HOU, G. *et al.* Developing a DNA barcode library for perciform fishes in the South China Sea:

species identification, accuracy, and cryptic diversity. **Molecular Ecology Resources**, v. 18, n. 1, p. 137-146, 2018.

JABLONSKI, D. *et al.* Cryptic diversity in the smooth snake (*Coronella austriaca*). **Amphibia-Reptilia**, v. 40.2, p. 179-192, 2019.

JADIN, R. C. *et al.* Hiding in the lianas of the tree of life: Molecular phylogenetics and species delimitation reveal considerable cryptic diversity of New World Vine Snakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 134, p. 61-65, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.022>.

JAN, G. **Elenco sistematico degli Ofidi Descritti e disegnati per l'Iconografia generale**. Lombardi, Milano: Tipografia A, 1863. doi: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.106683>.

KATOH, K.; ASIMENOS, G.; TOH, H. Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. *In*: POSADA, D. (Ed.). **Bioinformatics for DNA Sequence Analysis. Methods in Molecular Biology**. New Jersey, USA: Humana Press., 2009, p. 39-64.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.

KEOGH, J. S. Evolutionary implications of hemipenial morphology in the terrestrial Australian elapid snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 125, n. 2, p. 239-278, 1999.

KLACZKO, J.; MONTINGELLI, G. G.; ZAHER, H. A combined morphological and molecular phylogeny of the genus *Chironius* Fitzinger, 1826 (Serpentes: Colubridae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 171, p. 656-667, 2014.

KLEKCA, R. W. **Discriminant Analysis**. London, UK: Sage Publications, 1980, p. 71.

KLINGENBERG, C. P. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. **Development Genes and Evolution**, v. 226, n. 3, p. 113-137, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

LAOPICHIENPONG, N. *et al.* Assessment of snake DNA barcodes based on mitochondrial COI and Cytb genes revealed multiple putative cryptic species in Thailand. **Gene**, v. 594, n. 2, p. 238-247, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.017>.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. *In*: OLKIN, I. (Ed.). **Contributions to probability and statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling**. Palo Alto, CA: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

MARIN, J. *et al.* Hidden species diversity of Australian burrowing snakes (*Ramphotyphlops*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 110, n. 2, p. 427-441, 2013.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. *In*: 2010 gateway computing environments workshop (GCE), **Anais**. 2010.

MYERS, C. W.; CADLE, J. E. On the Snake Hemipenis, with Notes on *Psomophis* and Techniques of Eversion: A Response to Dowling. **Herpetological Review**, v. 34, n. 4, p. 295-302, 2003.

NICKLE, W. R. *et al.* On the Taxonomy and Morphology of the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970. **Journal of nematology**, v. 13, n. 3, p. 385-92, 1981. doi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300780> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2618084>.

NICOLAS, V. *et al.* Assessment of three mitochondrial genes (16S, Cytb, CO1) for identifying species in the Praomyini tribe (Rodentia: Muridae). **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e36586, 2012.

NOGUEIRA, C. C. *et al.* Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Localities Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. **South American Journal of Herpetology**, v. 14, n. Special Issue1, p. 1-274, 2019.

OLIVER, P. M. *et al.* Cryptic diversity in vertebrates: Molecular data double estimates of species diversity in a radiation of Australian lizards (*Diplodactylus*, Gekkota). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, p. 2001-2007, 2009.

PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, p. 1-14, 2010.

PALUMBI, S. R. *et al.* **The Simple Fool's Guide to P.C.R.** Honolulu, Hawaii University of Hawaii Press, 1991. .

PANTE, E.; SCHOELINCK, C.; PUILLANDRE, N. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. **Systematic Biology**, v. 64, n. 1, p. 152-160, 2015.

PESANTES, O. S. A Method for Preparing the Hemipenis of Preserved Snakes Published. **Journal of Herpetology**, v. 28, n. 1, p. 93-95, 1994.

PETERS, J. A. **Dictionary of Herpetology**. 1. ed. New York, NY: Hafner Publishing Company, 1964, 392 p.

PINTO, R. R.; MARQUES, O. A. V.; FERNANDES, R. Reproductive biology of two sympatric colubrid snakes, *Chironius flavolineatus* and *Chironius quadricarinatus*, from the Brazilian Cerrado domain. **Amphibia Reptilia**, v. 31, n. 4, p. 463-473, 2010.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 339-346, 2010.

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and**

evolution, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 93, p. 53, 2013.

R CORE TEAM. **R: a Language and Environment for Statistical Computing**. Viena, Áustria: [s.n.], 2018.

ROBERTO, I. J. *et al.* Unexpected but unsurprising lineage diversity within the most widespread Neotropical crocodylian genus *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae). **Systematics and Biodiversity**, v. 18, n. 4, p. 377-395, 2020. doi: <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1769222>.

RONQUIST, F. *et al.* Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

RUANE, S. *et al.* Cryptic and non-cryptic diversity in New Guinea ground snakes of the genus *Stegonotus* Duméril, Bibron and Duméril, 1854: a description of four new species (Squamata: Colubridae). **Journal of Natural History**, v. 52, n. 13-16, p. 917-944, 2018. doi: <https://doi.org/10.1080/00222933.2017.1391959>.

SHAPIRO, A. S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591-611, 1965. doi: <https://doi.org/10.2307/2333709>.

SILVA, M. A. A. **Revisão Taxonômica De Liophis Typhlus (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae)**. 2007. 91 p. Dissertação (Zoologia) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2007.

SILVA, F. M. *et al.* Aquatic adaptations in a Neotropical coral snake: A study of morphological convergence. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 56, n. 3, p. 382-394, 2018.

SLOWINSKI, J. B. A Phylogenetic Analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. **Journal of Herpetology**, v. 29, n. 3, p. 325, 1995.

SOARES, P. T. **Influência do paleoclima e clima atual nos padrões de diversidade beta taxonômica, funcional e filogenética de anfíbios anuros do Cerrado**. 2018. 54 p. Dissertação (Recursos Naturais do Cerrado) - Universidade Estadual do Goiás, Anápolis, GO, 2018.

SOERGEL, D., DEY, N., KNIGHT, R. *et al.* Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. **ISME J** 6, 1440-1444, 2012. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.208>.

SVANBÄCK, R.; EKLÖV, P. Genetic variation and phenotypic plasticity: causes of morphological variation in Eurasian perch. **Evolutionary Ecology Research**, v. 8, n. 1, p. 37-49, 2006.

- TORNABENE, L. et al. Support for a “Center of Origin” in the Coral Triangle: Cryptic diversity, recent speciation, and local endemism in a diverse lineage of reef fishes (Gobiidae: Eviota). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, p. 200-210, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.012>.
- TORRES-CARVAJAL, O. et al. Phylogeny, diversity and biogeography of Neotropical sipo snakes (Serpentes: Colubrinae: *Chironius*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 130, p. 315-329, 2019.
- TREVISAN, C. C. et al. Cryptic diversity and ancient diversification in the northern Atlantic Forest *Pristimantis* (Amphibia, Anura, Craugastoridae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 148, n. April, p. 106811, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106811>.
- UETZ, P. et al. **The Reptile Database**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 22 jun. 2023.
- VACHER, J. P. et al. Cryptic diversity in Amazonian frogs: Integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 112, p. 158-173, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.04.017>.
- WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249-278, 1989.
- WIENS, J. J.; SERVEDIO, M. R. Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1444, p. 631-636, 2000.
- WÜSTER, Wolfgang et al. Systematics of the *Bothrops atrox* Complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brazil: A Multivariate Analysis. **Herpetologica**, p. 263-271, 1996.
- ZAHER, H. Hemipenial morphology of the South American xenodontine snakes with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 240, p. 1-168, 1999.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999.

APÊNDICE A – LISTA DE VOUCHERS DOS MATERIAIS EXAMINADOS

Chironius flavolineatus. BRASIL: Sem localidade específica: CHUFPB27787, 27999, 21364, 21366, 31111, 27801, 27774, 12602, 12954, 11760. **ALAGOAS:** Camaragibe: MNRJ3981, Matriz de Camaragibe: CHUFPB4669, Joaquim Gomes: MUFAL14049, Limoeiro de Anadia: MUFAL13268, Maceió: MUFAL2064, 4185, 14048, 15865, 15870, 16327, 16328, 16328, 17116, 17146, Murici: MUFAL10888, 12217, 12867, 12868, 12869, 12870, 12871, 12872, 12873, Paripueira: MUFAL16136, Rio Largo: MUFAL13702, 14050, Teotônio Vilela: MUFAL13271, 13272, 13273, 13274, 13275. **AMAZONAS:** Humaitá: MNRJ19786. **BAHIA:** Barreiras: MNRJ3064, 3065. **CEARÁ:** Barbalha: CHUFC2127, URCA5393, 5394, 3893, Caririçu: URCA8249, 8251, 8250, Crato: CHUFC4375, 5633, 11014, 11892, 12026, 12027, 12029, 12030, 12031, 12032, 12110, 12111, 12112, 12113, 12265, 13388, 13389, 15133, 23, 9811, Icó: URCA22, Iguatu: URCA21, Mauriti: URCA12023, Ubajara: CHUFC4046, 4339, 14576, Tianguá: URCA15751, **GOIÁS:** Sem localidade: IVB3291, Uruçu: MNRJ7495. **MATO GROSSO:** Barra do Tapirapé: MNRJ588, 589, Cocalinho: FAP255, Xavantina: MNRJ6697, 9274, 9276. **MATO GROSSO DO SUL:** Aquidauana: MNRJ1511. **MINAS GERAIS:** Unaí: MNRJ10929, João Pinheiro: MNRJ12900, 12901, 14853, 14854, 14855, 14901, 15251, 15252, 15299, 15312, 15355, 17155, 17156, 17157, 17158, 17159, 17183, 17211, 17271, 17770, 17771, 17821, 17822, 19985, 19997, 20222. **PARÁ:** Marabá: CHUFC1270, Serra do Cachimbo: MNRJ6700. **PARAÍBA:** Alhandra: CHUFPB9374, Gurinhém: CHUFPB4667, João Pessoa: CHUFC2688, 4665, 4666, 8839, Rio Tinto: CHUFC4558. **PERNAMBUCO:** Água Preta: CHUFPE422, Araçoiaba: CHUFPE523, Cabo de Santo Agostinho: MUFAL17088, Ipojuca: CHPUFRPE4190, Paudalho: CHUFPE519, 520, 521, 522, Primavera: CHPUFRPE5059, Recife: CHUFPE21, São José: CHPUFRPE2002, Serra Talhada: CHUFPB4668, Tamandaré: CHPUFRPE4506, Timbaúba: CHUFPE394, 395, 396. **PIAUI:** Ilha Grande: CZDP(J2)0047, 0048, 0051. **SÃO PAULO:** Ribeirão Preto: CHUFC536, 622, 781, Serra Azul: CHUFC1878. **SERGIPE:** Pirambu: CHUFC892. **TOCANTINS:** Aliança do Tocantins: CHUFPB4860, 4861.

**APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS GENÉTICA DO GENE MITOCONDRIAL 16S UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS
DO TRABALHO**

Espécies	Voucher	Número de acesso	Referência
<i>Chironius</i>			
<i>C. bicarinatus</i>	LCBB18	MF673217	Hamdan et al., 2017
	LCBB21	MH602320	Hamdan et al., 2017
	MNRJ15083	MH602316	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
	MNRJ26255	MH602318	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
	MTR26905	MH602319	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
	MTR33355	MH602317	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
<i>C. brazili</i>	LCBB14	MF673213	Hamdan et al., 2017
	LCBB15	MF673214	Hamdan et al., 2017
	LCBB16	MF673215	Hamdan et al., 2017
	LCBB17	MF673216	Hamdan et al., 2017
	LBCC19	MF673218	Hamdan et al., 2017
<i>C. challenger</i>	IRSNB2659	MK086534	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. diamantina</i>	LCBB7	MF673206	Hamdan et al., 2017
	LCBB8	MF673207	Hamdan et al., 2017
	LCBB9	MF673208	Hamdan et al., 2017
<i>C. exoletus</i>	IRSNB18086	MK086537	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. flavolineatus</i>	25_6676	X	Presente trabalho
	28_4636	X	Presente trabalho
	29_8888	X	Presente trabalho
	30_3503	X	Presente trabalho

	31	X	Presente trabalho
	LCBB1	MF673201	Hamdan et al., 2017
	LCBB2	MF673202	Hamdan et al., 2017
	LCBB3	MF673203	Hamdan et al., 2017
	LCBB4	MF673204	Hamdan et al., 2017
	LCBB5	MF673205	Hamdan et al., 2017
	LCBB11	MF673210	Hamdan et al., 2017
	LCBB13	MF673213	Hamdan et al., 2017
	LCBB31	MF673225	Hamdan et al., 2017
<i>C. flavopictus</i>	QCAZ5750	MK086554	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ5863	MK086555	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ9162	MK086556	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ11239	MK086557	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. foveatus</i>	Não disponível	HM582210	Klaczko <i>et al.</i> 2014
	LCBB29	MF673196	Hamdan et al., 2017
	MTR12348	MH602326	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
<i>C. foveatus</i>	MTR12414	MH602327	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
<i>C. fuscus</i>	ROM39442	MK086585	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	ROM42601	MK086586	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. gouveai</i>	CT453	MH602315	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
	CT2635	MH602314	Entiauspe-Neto <i>et al.</i> 2020
<i>C. grandisquamis</i>	QCAZ5046	MK086587	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ5634	MK086588	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ5733	MK086589	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ8026	MK086590	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ8500	MK086591	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ11054	MK086592	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. laevicollis</i>	LCBB20	MF673219	Hamdan et al., 2017
<i>C. leucometapus</i>	CORBIDI15562	MK086593	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018

<i>C. maculiventris</i>	LCBB23	MF673221	Hamdan <i>et al.</i> 2017
<i>C. monticola</i>	QCAZ5184	MK086605	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ6374	MK086607	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ7267	MK086610	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ7991	MK086611	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	QCAZ8069	MK086612	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. multiventris</i>	CORBIDI9308	MK086615	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
	CORBIDI13928	MK086618	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>C. scurrulus</i>	IRSNB18018	MK086626	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
Grupos externos			
<i>Dendrophidion brunneum</i>	QCAZ5037	MK086631	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>Dendrophidion graciliverpa</i>	QCAZ10561	MK086633	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>Dipsas catesbyi</i>	QCAZ13558	MK086634	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>Drymarchon corais</i>	Não disponível	HM582220	Pyron <i>et al.</i> 2011
<i>Drymoluber brazili</i>	Não disponível	HM582219	Klaczko <i>et al.</i> 2014
<i>Drymoluber dichrous</i>	QCAZ13568	MK086636	Torres-Carvajal <i>et al.</i> 2018
<i>Leptophis ahaetulla</i>	Não disponível	HM582222	Klaczko <i>et al.</i> 2014
<i>Opheodrys aestivus</i>	USNMHerp574606	MN135526	Gotte <i>et al.</i> (não publicado)
	USNMHerp575051	MN135526	Gotte <i>et al.</i> (não publicado)
<i>Oxybelis aeneus</i>	Não disponível	HM582225	Klaczko <i>et al.</i> 2014
<i>Oxybelis fulgidus</i>	Não disponível	HM582226	Klaczko <i>et al.</i> 2014

APÊNDICE C – COMPARAÇÃO DOS CARACTERES MORFOMÉTRICOS E MERÍSTICOS AFERIDOS DURANTE AS ANÁLISES DOS ESPÉCIMES DAS TRÊS POPULAÇÕES DE *CHIRONIUS FLAVOLINEATUS*.

Caractere	Machos			Fêmeas		
	CE	CH	RNPB	CE	CH	RNPB
Cca	19,40 - 26,91 (22,90 ± 1,35; 10)	18,50 - 23,57 (21,45 ± 1,60; 26)	20,68 - 27,60 (22,27 ± 3,80; 6)	20,57 - 26,79 (23,49 ± 0,73; 11)	19 - 25 (22,23 ± 1,44; 44)	19,72 - 27,50 (23,76 ± 3,22; 6)
Lca	7,16 - 12,87 (9,59 ± 1,41; 10)	6,43 - 10,90 (8,54 ± 1,21; 26)	8,34 - 12,24 (9,45 ± 2,06; 6)	8,35 - 13 (10,58 ± 0,60; 11)	6,96 - 14,47 (9,08 ± 1,61; 44)	8,23 - 12,16 (9,96 ± 1,63; 6)
Cca/Lca	1,89 - 2,91 (2,44 ± 0,29; 10)	2,03 - 3,14 (2,53 ± 0,23; 26)	2,25 - 2,54 (2,36 ± 0,13; 6)	1,94 - 2,75 (2,23 ± 0,11; 11)	1,63 - 3,23 (2,48 ± 0,31; 44)	2,26 - 2,50 (2,39 ± 0,10; 6)
DRO	5,73 - 8,96 (7,09 ± 0,59; 10)	5,43 - 7,61 (6,57 ± 0,65; 26)	5,79 - 8,81 (6,98 ± 1,54; 6)	4,11 - 8,86 (6,85 ± 0,51; 11)	5,95 - 8,56 (6,81 ± 0,61; 44)	6,11 - 8,38 (7,27 ± 0,97; 6)
LF	3,26 - 5,55 (4,44 ± 0,51; 10)	2,98 - 4,86 (3,96 ± 0,49; 26)	3,29 - 4,95 (4,07 ± 0,76; 6)	3,18 - 6,20 (4,66 ± 1,11; 11)	2,97 - 5,09 (3,99 ± 0,35; 44)	3,13 - 4,92 (3,89 ± 0,86; 6)
LF/DRO	0,56 - 0,68 (0,62 ± 0,03; 10)	0,45 - 0,72 (0,60 ± 0,04; 26)	0,49 - 0,66 (0,58 ± 0,01; 6)	0,47 - 1,28 (0,70 ± 0,15; 11)	0,45 - 0,69 (0,588 ± 0,04; 44)	0,40 - 0,61 (0,53 ± 0,08; 6)
CHO	4,22 - 5,29 (4,87 ± 0,41; 8)	3,93 - 5,59 (4,71 ± 0,50; 22)	4,37 - 5,76 (4,89 ± 0,40; 4)	4,42 - 5,62 (4,98 ± 0,33; 10)	3,69 - 5,88 (4,73 ± 0,36; 39)	4,01 - 4,95 (4,49 ± 0,36; 6)
CVO	3,21 - 4,84 (4,13 ± 0,56; 8)	3,56 - 4,99 (4,15 ± 0,39; 22)	3,68 - 4,60 (4,19 ± 0,46; 4)	3,46 - 4,85 (4,38 ± 0,40; 10)	3,14 - 4,97 (4,11 ± 0,34; 39)	3,76 - 4,53 (4,20 ± 0,28; 6)
CVO/CHO	0,76 - 0,91 (0,84 ± 0,05; 8)	0,75 - 1,06 (0,88 ± 0,056; 22)	3,68 - 4,60 (4,19 ± 0,04; 4)	0,78 - 0,94 (0,87 ± 0,08; 10)	0,69 - 0,99 (0,87 ± 0,05; 39)	0,85 - 1,02 (0,94 ± 0,07; 6)
PO	0,68 - 1,62 (1,30 ± 0,37; 8)	1,07 - 1,91 (1,50 ± 0,22; 21)	1,16 - 1,34 (1,25 ± 0,09; 3)	0,93 - 1,39 (1,19 ± 0,17; 9)	1,17 - 1,93 (1,58 ± 0,16; 28)	0,93 - 1,92 (1,45 ± 1,40; 6)
LMC	4,69 - 14,87 (9,16 ± 3,57; 12)	5,25 - 11,40 (8,23 ± 1,59; 26)	6,93 - 16,22 (8,76 ± 4,51; 6)	6,67 - 12,17 (9,93 ± 1,70; 11)	6,48 - 11,92 (9,16 ± 1,38; 44)	7,170 - 12,450 (9,75 ± 2,33; 6)
AMC	7,05 - 15,06 (11,20 ± 2,58; 12)	4,50 - 13,41 (9,81 ± 1,63; 26)	7,06 - 15,34 (10,38 ± 3,10; 6)	9,10 - 14,90 (12,36 ± 1,19; 11)	6,33 - 15,39 (11,11 ± 1,94; 44)	9,27 - 15,21 (13,19 ± 2,47; 6)
AMC/LMC	0,88 - 2,41 (1,28 ± 0,52; 12)	0,54 - 1,74 (1,22 ± 0,17; 26)	0,94 - 1,29 (1,10 ± 0,17; 6)	1,06 - 1,48 (1,25 ± 0,15; 11)	0,88 - 1,60 (1,21 ± 0,16; 44)	1,18 - 1,66 (1,37 ± 0,19; 6)
CRC	519 - 793 (647,60 ± 61,34; 11)	512 - 735 (595,20 ± 67,72; 26)	560 - 793 (634,80 ± 120,23; 6)	601,0 - 802,0 (686,10 ± 29,77; 11)	511 - 786 (635,90 ± 61,80; 44)	541 - 834 (694,70 ± 126,78; 6)
CC	348 - 500 (425 ± 39,41; 11)	326 - 452 (375 ± 42,83; 24)	326 - 457 (383,40 ± 66,77; 5)	367 - 479 (417,20 ± 20,10; 10)	312 - 553 (391,30 ± 49,38; 43)	333 - 495 (415,60 ± 68,10; 5)
CC/CRC	0,57 - 0,69 (0,65 ± 0,01; 10)	0,51 - 0,70 (0,63 ± 0,02; 24)	0,52 - 0,65 (0,60 ± 0,06; 5)	0,56 - 0,65 (0,61 ± 0,02; 10)	0,51 - 0,74 (0,61 ± 0,03; 43)	0,58 - 0,61 (0,60 ± 0,01; 5)

CT	383 - 1293 (1025 ± 99,49; 11)	841,0 - 1187,0 (963,80 ± 109,04; 24)	929 - 1250 (1025 ± 179,31; 5)	971 - 1281 (1099 ± 45,90; 10)	823 - 1291 (1027 ± 107,33; 43)	874 - 1329 (1109 ± 194,68; 5)
VE	153 - 160 (155,70 ± 1,94; 9)	150 - 161 (154 ± 2,15; 25)	153 - 157 (154,70 ± 2,08; 6)	155 - 164 (159,10 ± 4,50; 8)	152 - 165 (157 ± 3,70; 43)	156 - 161 (158,70 ± 2,06; 6)
SC	141 - 153 (145,40 ± 3,88; 9)	128 - 148 (138 ± 4,39; 22)	103,0 - 145,0 (125,20 ± 21,07; 5)	133 - 144 (138,20 ± 3,05; 4)	124 - 144 (134 ± 4,68; 33)	128 - 139 (134,20 ± 4,64; 4)

Legenda: Os valores inseridos referem-se ao “mínimo-máximo (média ± desvio padrão; tamanho da amostra)”. Abreviações: Cca (comprimento da cabeça); Lca (largura da cabeça); Cca/Lca (razão de Cca por Lca); DRO (distância rostro orbital); LF (largura do focinho); LF/DRO (razão de LF por DRO); CHO (comprimento horizontal do olho); CVO (comprimento vertical do olho); CVO/CHO (razão de CVO por CHO); PO (profundidade do olho); LMC (largura ao meio do corpo); AMC (altura ao meio do corpo); AMC/LMC (razão de AMC por LMC); CRC (comprimento rostro cloacal); CC (comprimento da cauda); CC/CRC (razão de CC por CRC); CT (comprimento total); VE (número de escamas ventrais) e SC (número de escamas subcaudais).