



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

CICERA SILVILENE LEITE MATIAS

**ESTUDO DO STATUS TAXONÔMICO DE UMA POPULAÇÃO DE *Bothrops gr atrox*
(SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE) DE UM BREJO DE ALTITUDE NO
NORDESTE DO BRASIL**

FORTALEZA

2021

CICERA SILVILENE LEITE MATIAS

ESTUDO DO STATUS TAXONÔMICO DE UMA POPULAÇÃO DE *Bothrops gr atrox*
(SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE) DE UM BREJO DE ALTITUDE NO
NORDESTE DO BRASIL

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.

Orientadora: Prof. Dra. Diva Maria Borges-Nojosa.

FORTALEZA

2021

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)

M38e Matias, Cicera Silvilene Leite Matias.

Estudo do status taxonômico de uma população de Bothrops gr. atrox (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) de um Brejo de Altitude no Nordeste do Brasil / Cicera Silvilene Leite Matias Matias. – 2021.
45 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Diva Maria Borges Nojosa.

1. Biomolecular. 2. Distribuição geográfica. 3. Espécies crípticas . 4. Morfologia. 5. Serpente. I. Título.
CDD 578.7

CICERA SILVILENE LEITE MATIAS

ESTUDO DO STATUS TAXONÔMICO DE UMA POPULAÇÃO DE *Bothrops gr atrox*
(SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE) DE UM BREJO DE ALTITUDE NO
NORDESTE DO BRASIL

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: 10/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Diva Maria Borges-Nojosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Daniella Pereira Fagundes de França
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)

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

Prof. Dr. Vicente Vieira Faria
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Às mulheres nordestinas

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Profa. Dra. Diva Maria Borges-Nojosa, pela orientação durante meus dois anos de mestrado.

Ao prof. Dr. Robson Ávila, por todo ensinamento que transmite.

Ao prof. Dr. Vicente Farias, pela parceria e confiança.

Aos professores participantes da banca examinadora, Drs. Robson Ávila, Daniella França, Vicente Faria e Daniel Cassiano, pelo tempo e valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, em especial Natanael, Arnaldo e Mirian, pela parceria durante esses dois anos, acolhimento e momentos compartilhados.

Aos companheiros do NUROF-UFC, particularmente Roberta, Castiele (Cacá), Robson Victor, Taty, John e Rafael, muito obrigada por tudo, principalmente pelos momentos oferecidos para que eu não atrasasse a pesquisa.

Aos meus amigos (sem citar nomes), por toda força para que eu insistisse em meus sonhos.

À minha família, essencialmente Mainha, Papai, meus irmãos e a Mariazinha, minha sobrinha, por estarem presentes, pela confiança e por me ensinarem que família é acolhimento, compartilhamento e amor.

À minha amada esposa, Edina, não tenho dúvida que, se não fosse o seu companheirismo, eu não teria concluído esta etapa. Te amo!

Aos orixás, que através da fé me erguem nos momentos de aflitos internos.

A mim, por ter enfrentado todas as dificuldades, ter me colocado de pé e por não desistir, mesmo quando essa era a única opção que conseguia ver.

O ofá do caçador é o meu caminho.

RESUMO

A taxonomia integrativa, que une diferentes análises de informações e caracteres, pode ser uma excelente aliada para estudos sistemáticos e taxonômicos. O conhecimento sobre a biodiversidade é inconstante, pois assim como novas espécies surgem através de revisões taxonômicas ou por novas descrições, também sofrem com extinções, muitas vezes antes mesmo de serem conhecidas pela ciência, sobretudo, quando se trata de espécies crípticas. O Brasil apresenta uma enorme riqueza de espécies (e subespécies) de répteis, sendo uma das maiores do mundo. Abriga uma diversidade de 856 espécies (mais 33 spp.), estando atualmente atrás somente da Austrália (1.132 spp.) e do México (980 spp.). O gênero *Bothrops* é um clado com pelo menos 51 espécies de serpentes peçonhentas, destas, 34 são encontradas no Brasil. Devido a enorme diversidade e à relativa raridade de algumas espécies, e pelas divisões filogenéticas do gênero, algumas espécies de *Bothrops* podem ser consideradas como candidatas a espécies críticas. Desta forma, buscamos investigar o *status* taxonômico de uma população relictual de *Bothrops* gr. *atrox* registrada em um Brejo de altitude no Planalto da Ibiapaba, no Estado do Ceará. Para alcançar esse objetivo, utilizamos dados morfológicos e moleculares, especificamente o gene 12S, e realizamos análises de filogenia molecular, além de uma análise de variação multivariada (MANOVA). Essas abordagens nos permitiram obter uma compreensão mais aprofundada das relações evolutivas e das diferenças entre as populações ou espécies estudadas, contribuindo para uma análise integrada e robusta dos dados biológicos. Os nossos resultados apontam para a existência de um novo táxon para *Bothrops aff. atrox*, no qual, embora filogeneticamente seja muito próximo de *B. atrox* e compartilhe caracteres morfológicos semelhantes aos outros exemplares do grupo taxonômico, se trata de uma nova espécie críptica endêmica de um Brejo de altitude do Ceará.

Palavras-chave: biomolecular; distribuição geográfica; espécies crípticas; morfologia; serpente.

ABSTRACT

An integrative taxonomy, which combines various analyses of information and characters, can serve as an excellent ally for systematic and taxonomic studies. Knowledge about biodiversity is inherently variable, as new species emerge through taxonomic revisions or new descriptions, while others face extinction, often before they are even recognized by science, particularly in the case of cryptic species. Brazil exhibits an immense richness of reptile species and subspecies, ranking among the highest globally. The country harbors a diversity of 856 species, along with an additional 33 subspecies, currently positioned behind only Australia, with 1,132 species, and Mexico, with 980 species. The genus *Bothrops* is a clade comprising at least 51 venomous snake species, of which 34 are found in Brazil. Due to the extensive diversity, the relative rarity of certain species, and the phylogenetic divisions within the genus, some species of *Bothrops* may be considered candidates for critical species status. In this manner, we aim to investigate the taxonomic status of a relictual population of *Bothrops* gr. *atrox* recorded in an upland Brejo within the Ibiapaba Plateau, in the state of Ceará. To achieve this goal, we used morphological and molecular data, specifically the 12S gene, and performed molecular phylogenetic analyses, as well as a multivariate variation analysis (MANOVA). These approaches allowed us to gain a deeper understanding of the evolutionary relationships and differences between the populations or species studied, contributing to an integrated and robust analysis of the biological data. Our results indicate the existence of a new taxon for *Bothrops* aff. *atrox*. Although phylogenetically closely related to *B. atrox* and sharing morphological characters with other specimens of the taxonomic group, it represents a cryptic species endemic to an upland Brejo in Ceará.

Keywords: biomolecular; geographical distribution; cryptic species; morphology; snake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista do Parque Nacional de Ubajara: A- Vista da paisagem e relevo; B- Detalhe da vegetação; C- Formações rochosas que abrigam as grutas.....	25
Figura 2 - Exemplar adulto de <i>Bothrops aff. atrox</i> , com detalhe da coloração natural da espécie.....	26
Figura 3 - Indivíduo jovem de <i>Bothrops aff. atrox</i>	26
Figura 4 - Árvore filogenética recuperando os diversos grupos de <i>Bothrops</i> gr. <i>atrox</i> , com posicionamento de <i>Bothrops aff. atrox</i> da população do Planalto da Ibiapaba – Ceará	30
Figura 5 - Biplot da AFD: <i>Bothrops atrox</i> (preto), <i>Bothrops leucurus</i> (vermelho), <i>Bothrops moojeni</i> (verde) e <i>Bothrops aff. atrox.</i> (azul); AFD (a) – fêmeas e AFD (b) - machos	31
Figura 6 - Distribuição no Brasil das espécies do <i>Bothrops</i> gr. <i>atrox</i> , com destaque para <i>Bothrops aff. atrox</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela 1 - Sequências do gene RNA 12S, das espécies do gênero <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus durissus</i> (outgroup), utilizados no estudo	18
Tabela 2 - Distâncias entre os pares de bases do gênero <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus durissus</i> (outgroup) - Gene 12S	19
Tabela 3 - Distância dentre os grupos do gênero <i>Bothrops</i> - gene 12S	21
Tabela 4 - Distância entre os grupos do gênero <i>Bothrops</i> - gene 12S	21
Tabela 5 - Dados morfométricos dos exemplares adultos de <i>Bothrops aff. atrox</i>	27
Tabela 6 - Dados merísticos dos exemplares adultos de <i>Bothrops aff. atrox</i>	28
Tabela 7 - Dados de folídose dos exemplares adultos e jovens de <i>Bothrops aff. atrox</i>	29
Tabela 8 - Dados morfométricos e merísticos dos machos e fêmeas adultos de espécies do <i>Bothrops gr. atrox</i>	32
Tabela 9 - Dados merísticos dos machos e fêmeas adultos de espécies de <i>Bothrops gr. atrox</i>	33
Tabela 10 - Dados da folídose de machos e fêmeas, adultos e jovens de espécies de <i>Bothrops gr. atrox</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADF	Análise de função discriminante
<i>aff.</i>	<i>Affinis</i> : afim a, próximo de
BI	Inferência Bayesiana
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CIBIO	Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos
CTHUFC	Coleção de Tecidos Herpetológicos da Universidade Federal do Ceará
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDA	Escamas Dorsais Anteriores
EDC	Escamas Dorso Cefálicas
EDM	Escamas Dorsais Medianas
EDP	Escamas Dorsais Posteriores
EIL	Escamas Infralabiais
ES1	Escama 4 ^a Supralabial, nível anterior
ES2	Escama 4 ^a Supralabial, nível mediano
ES3	Escama 4 ^a Supralabial, nível posterior
ESC	Escamas Subcaudais
EVE	Escamas Ventrais
gr.	Grupo taxonômico
ICZN	Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica
LIO	Linhos Intersupraoculares
MANOVA	Multivariate Analysis of Variance
MDL	Manchas Dorsolaterais no Corpo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
SLB	Escamas Supralabiais
sp / spp	Espécie / Espécies
sp. nov.	Nova Espécie
ssp / sspp	Subespécie / Subespécies

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Amostragem molecular	16
3.2	Análise molecular e abordagens filogenéticas.....	17
3.3	Amostragem morfológica.....	22
3.4	Análise morfológica merística	22
3.5	Registro da nomenclatura e aspectos éticos	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	A população de <i>Bothrops aff. atrox</i> do Planalto da Ibiapaba-CE.....	24
4.1.1	Dados da espécie	24
4.1.2	Dados morfométricos e merísticos	27
4.2	Análise molecular.....	29
4.3	Análise morfológica	30
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	APÊNDICE A– MATERIAL ESTUDADO	45

1 INTRODUÇÃO

Caracteres de folidose e morfométricos têm sido as ferramentas mais utilizadas nas revisões e descrições de espécies de Squamata, inclusive as serpentes (Hoge; Belluomini, 1957; Ferrarezzi; Freire, 2001; Silva; Rodrigues, 2008). Porém, a identificação dos organismos baseados somente nos caracteres morfológicos pode ser insuficiente, em parte por ser subjetiva, ou por não representar as relações filogenéticas evolutivas, que podem ser obtidas por dados moleculares (Pires; Marinoni, 2010). Desta forma, a taxonomia integrativa, que une diferentes análises de informações e caracteres, pode ser uma excelente aliada para estudos sistemáticos (Padial *et al.*, 2010; Aguilar *et al.*, 2013). Os recursos moleculares têm sido aplicados de forma eficiente nas revisões sistemáticas, taxonômicas e na constatação e definição de diferentes e novos grupos animais (Oliveira *et al.*, 2012; Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Timms *et al.*, 2019). A soma dessas metodologias traz, além da visão taxonômica, o enfoque filogenético envolvendo o novo táxon abordado no estudo.

Darwin (1859) apresentou a Teoria da Evolução, que explica o fluxo entre especiação e extinção através das mudanças adaptativas que ocorrem nas espécies, buscando compreender a origem do padrão de semelhanças e diferenças. Mayr (1982), entretanto, considerou a ideia de Darwin insatisfatória, considerando que a teoria estava equivocada para a hereditariedade. No ponto de vista dele, a especiação é um dos mecanismos usados para tentar explicar essa teoria, de forma que busca a compreensão do processo adaptativo e envolve o estabelecimento de barreiras intrínsecas ao fluxo gênico entre as populações intimamente associadas aos mecanismos de isolamento reprodutivo (Mayr; Diamond, 2001). Desta forma, para Mayr (2000), espécies são grupos de populações naturais intercruzantes que são reprodutivamente isoladas de outros grupos.

O conhecimento sobre a biodiversidade é inconstante, pois assim como novas espécies surgem através de revisões taxonômicas e/ou por novas descrições, também sofrem com extinções, muitas vezes antes mesmo de serem conhecidas pela ciência, sobretudo, quando se trata de espécies crípticas (Puerto *et al.*, 2001). Espécies crípticas são organismos morfologicamente semelhantes, que diferem no comportamento, fisiologia e/ou genética. Essas espécies camufladas entre outros organismos são incluídas como pares ou grupos de animais (complexo de espécies) e não recebem atenção que merecem, sendo encontrados em diferentes grupos de animais de invertebrados e vertebrados (Witt *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2017).

O Brasil apresenta uma enorme riqueza de espécies (e subespécies) de répteis, sendo uma das maiores do mundo. Abriga uma diversidade de 856 espécies (mais 33 spp.), estando atualmente atrás somente da Austrália (1.132 spp.) e do México (980 spp.) (Guedes; Entiauspe-Neto; Costa, 2022; Uetz; Freed; Hosek, 2020). O Nordeste apresenta cerca de 403 spp. (10 spp.) (Guedes; Entiauspe-Neto; Costa, 2022), sendo que o Estado do Ceará conta atualmente com 133 spp. (Borges-Nojosa; Ávila; Lima, 2021) de répteis. São valores que podem estar subestimados devido a carência de levantamentos e estudos taxonômicos em geral.

Desta diversidade da herpetofauna brasileira, 435 spp. são serpentes, distribuídas nos mais diversos habitats, nas cinco regiões políticas brasileiras, inclusive sendo registradas 201 spp. (9 spp.) no Nordeste e 71 no Ceará. Uma das Famílias de serpentes, a Viperidae, está representada no território brasileiro por 34 spp. (mais 4 spp.), com os seguintes gêneros: *Bothrops* (30 spp.; 1 spp.), *Bothrocophias* (2 spp.), *Crotalus* (1 sp.; 3 spp.) e *Lachesis* (1 sp.), seis destas espécies são registradas no Ceará (Borges-Nojosa; Ávila; Lima, 2021). Essas serpentes são importantes do ponto de vista médico e farmacológico (Carvalho, 2006), e apresentam funções ecológicas importantes por atuarem no controle de populações de presas (invertebrados e vertebrados) (Martins *et al.*, 2002).

Bothrops é um clado com pelo menos 51 espécies de serpentes peçonhentas (Uetz; Freed; Hosek, 2020), destas 34 são encontradas no Brasil (Guedes; Entiauspe-Neto; Costa, 2022). Com base em estudos com caracteres morfológicos e moleculares, *Bothrops* foi dividido em dois gêneros: *Bothrocophias* e *Bothrops* (Gutberlet; Campbell, 2001; Wüster *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2012). No entanto, Fenwick *et al.* (2009) dividiu *Bothrops* em três clados, onde incluiu *Rhinocerophis* como mais um novo gênero. A proposta não foi aceita, por não resolver a parafilia de *Bothrops*, permanecendo uma filogenia inconsistente. A parafilia de *Bothrops*, provavelmente ocorre devido à alta semelhança morfológica entre as espécies e ao número de táxons desconhecidos. Fenwick *et al.* (2009) é a proposta taxonômica mais recente para os Botropoides sul-americanos.

Wüster *et al.* (2002) dividiram o gênero *Bothrops* em sete grupos: *Bothrops* gr. *alternatus*, *B.* gr. *atrox*, *B.* gr. *jararaca*, *B.* gr. *jararacussu*, *B.* gr. *michrophthalmus*, *B.* gr. *neuwiedi* e *B.* gr. *taeniatus*. Segundo Fenwick *et al.* (2009), o *B.* gr. *atrox* abriga 12 espécies, que são: *B. asper*, *B. atrox*, *B. brazili*, *B. caribbaeus*, *B. isabelae*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. osbornei* e *B. punctatus*. Entretanto, Carrasco *et al.*, (2012) aponta para o mesmo grupo, somente sete espécies, que são: *B. asper*, *B. atrox*, *B. brazili*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus* e *B. moojeni*. Já Zaher *et al.*, (2019) falam

de 13 espécies, interligadas da seguinte forma: $[(B. caribbaeus + B. lanceolatus) + [(B. asper) + [(B. moojeni + B. leucurus) + (B. colombiensis + (B. isabelae + (B. atrox + B. marajoensis))]]]$, enquanto Hamdan *et al.*, (2019) também citam 13 espécies, mas com o seguinte arranjo: $[(B. jararacussu + B. brazili) + [(B. osbornei + B. punctatus) + [(B. caribbaeus + B. lanceolatus) + [(B. asper) + (B. leucurus + (B. moojeni + (B. colombiensis + (B. isabelae + (B. atrox + B. marajoensis))))]]]]]$.

Devido a enorme diversidade, à relativa raridade de algumas espécies e a essas divisões do gênero *Bothrops* em complexos sistemáticos (Wüster *et al.*, 2002; Fenwick *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2012; Timms *et al.*, 2019), algumas espécies do gênero podem ser consideradas como candidatas a espécies críticas, que são organismos morfologicamente semelhantes que diferem no comportamento, fisiologia e/ou genética. Essas espécies camufladas entre outros organismos são inclusas como pares ou grupos de animais (complexo de espécies) e não recebem a atenção que merecem, sendo encontrados em diferentes grupos de animais de invertebrados e vertebrados (Witt *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2017).

Considerando todos estes pontos, voltamos os olhares para uma população isolada de *Bothrops*, localizada ainda em 1998 em uma área de Brejo de altitude do Nordeste do Brasil, o Planalto da Ibiapaba (Castro *et al.*, 2019), ocorrendo também nas dependências do Parque Nacional de Ubajara ($3^{\circ}50'19.637"S; 40^{\circ}53'54.794"W$), uma Unidade de Conservação Federal de proteção Integral. Os Brejos de altitude são áreas relictuais de mata úmida, resquícios de expansões e retrações pretéritas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica durante momentos do Quaternário, através da região do Nordeste brasileiro (Borges-Nojosa; Caramaschi, 2003; Sobral-Souza, *et al.*, 2015; Sobral-Souza; Lima-Ribeiro, 2017). Após a retração destes grandes corpos vegetacionais, ficaram apenas vestígios em áreas isoladas, chamados de “Brejos de Altitude” devido a umidade ambiental e a altitude onde estão (Andrade-Lima, D., 1982; Borges-Nojosa; Caramaschi, 2003). Vanzolini (1981), ao visitar a Chapada do Araripe, percebeu que os brejos abrigam uma herpetofauna preciosa, composta por espécies umbrófilas amazônicas e atlânticas, além de várias espécies endêmicas. Esta percepção vem sendo amplamente corroborada por estudos mais recentes (Borges-Nojosa; Caramaschi, 2003; Borges-Nojosa, 2007; Ribeiro *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2019) e pela descrição de novas espécies, como por exemplo os lagartos *Colobosauroides cearensis* Cunha, Lima-Verde e Lima, 1991, *Leposoma baturitensis* Rodrigues e Borges, 1997 e *Placosoma limaverdorum* Borges-Nojosa, Caramaschi e Rodrigues, 2016; as serpentes *Atractus ronnie* Passos, Fernandes e Borges-Nojosa, 2007 e *Apostolepis thalesdelemai* Borges-Nojosa, Lima, Bezerra e Harris, 2015; e os anfíbios

Adelophryne baturitensis e *A. maranguapensis* Hoogmoed, Borges e Cascon, 1994 e *Rhinella casconi* Roberto, Brito e Thomé, 2014 (Borges-Nojosa *et al.*, 2016).

Desta forma, considerando o interessante histórico biogeográfico das áreas de Brejos de altitude e a riqueza da herpetofauna endêmica que abrigam, levantamos a seguinte questão: qual a condição taxonômica da população relictual de *Bothrops aff. atrox* registrada no Planalto da Ibiapaba? As hipóteses são: H(0) – constitui um caso interessante de população relictual de *Bothrops atrox*, sendo relevante por constituir mais um comprovativo da ligação pretérita das matas úmidas; ou H(1) - essa população isolada já teria passado pelo processo evolutivo de especiação, compondo assim um novo táxon endêmico de um Brejo de altitude do Estado do Ceará.

Com isto, apresentamos um estudo, no qual usamos a taxonomia integrativa, associando evidências de análises filogenéticas e biologia molecular usando sequenciamentos de DNAr e caracteres morfológicos para definir o provável *status* taxonômico desta população de *Bothrops gr. atrox*.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o *status* taxonômico de uma população relictual de *Bothrops gr. atrox* registrada em um Brejo de altitude no Planalto da Ibiapaba, no Estado do Ceará.

2.2. Objetivos Específicos

Realizar a avaliação do *status* taxonômico utilizando comparativamente os métodos filogenéticos pela Biologia Molecular e pela Morfologia; e

Verificar se existem variações morfológicas sexuais na população, caracterizando dimorfismo sexual no táxon.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, considerando as limitações biomoleculares e morfológicas, estamos considerando apenas nove espécies das representantes do grupo apresentadas por Zaher *et al.* (2019), com distribuição geográfica na América do Sul e Central e em algumas ilhas do Caribe, que são: *Bothrops asper* Garman, 1883, na América Central e noroeste da América do Sul; *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758), na região norte da América do Sul; *Bothrops caribbaeus* (Garman, 1887), na Ilha de Santa Lúcia; *Bothrops colombiensis* (Hallowell, 1845), no Noroeste

da América do Sul; *Bothrops isabelae* (Sandner Montilla, 1979), na Venezuela; *Bothrops lanceolatus* (Bonnaterre, 1790), na Ilha de Martinica; *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824), na costa leste do Brasil; *Bothrops marajoensis* (Hoge, 1966), no Norte do Pará e Ilha de Marajó; e *Bothrops moojeni* (Hoge, 1966), no Cerrado.

3.1 Amostragem molecular

Para realizar o estudo de avaliação da relação filogenética da espécie da população do Planalto da Ibiapaba, denominada como *Bothrops aff. atrox* com as demais do gênero *Bothrops*, utilizamos seis amostras de tecidos (fígado e músculo) da Coleção de Tecidos Herpetológicos da Universidade Federal do Ceará – CTHUFC e da Coleção de Tecidos Herpetológicos da Universidade Regional do Cariri – URCA-T. As amostras encontravam-se preservadas em álcool etílico absoluto.

Extraímos o DNA genômico destas amostras através do kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen. Inc), de acordo com o protocolo do fabricante, no Centro de Análises Moleculares (CTM), do Centro de Investigação da Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO-UP), da Universidade do Porto. Em seguida, realizamos a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene mitocondrial 12S do RNA ribossômico (12S rRNA), utilizando os primers 12Sa (CTGGGATTAGATACCCACTAT) e 12Sb (GAGGGTGACGGGGCGGTGT GT) (Kocher *et al.*, 1989), usando uma mistura de reação de 20 µl composta por 4,0 µl de Blend MasterMix (Hot Fire), 0,5 µl de 10 pmol de cada primers, 2,0 µl de DNA e água destilada, seguindo Harris *et al.* (1998). Usamos no termociclador os seguintes ciclos: 94°C (13 min); 35 × [94°C (30 seg), 47°C (45 seg) e 72°C (1 min)]; e 72°C (10 min)]. Verificamos em um transiluminador para eletroforese as reações positivas, que foram enviadas posteriormente à Beckman Coulter Genomics para purificação e sequenciamento.

Complementamos a amostragem de sequenciamentos das espécies de *Bothrops* com mais 60 sequências disponíveis localizadas no banco de dados genéticos GenBank, das quais 59 são do gênero *Bothrops*, representando os sete grupos (*B. gr. alternatus* – seis; *B. gr. atrox* – 14; *B. gr. jararaca* – três; *B. gr. jararacussu* – 19; *B. gr. microphthalmus* – duas; *B. gr. neuwiedi* – seis; e *B. gr. taeniatus* - nove), e uma de *Crotalus*, utilizada como *Outgroup* (Tabela. 1). As novas sequências obtidas ainda serão tombadas e depositadas no GenBank Overview – NCBI posteriormente, somente durante o processo de publicação do artigo.

Para montar e editar as sequências, usamos o software BioEdit free v.7.2 (Hall, 1999). Posteriormente, eram confirmadas com um BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na

base de dados GenBank. Para facilitar o alinhamento na configuração padrão de todas as sequências, usamos o algoritmo MUSCLE no programa Geneious Trial v.7.1.3.

Quanto aos cuidados éticos, providenciamos a transferência do material genético para Portugal, local onde foram realizados os sequenciamentos, resguardado por um acordo celebrado entre a Universidade Federal do Ceará (UFC), o Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO-InBio) e o Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente (ICETAS), da Universidade do Porto (UP), resultando no Termo de Transferência de Material (TTM), assinado em Setembro de 2018 e no Cadastro SISGEN No. 2949980.

3.2 Análise molecular e abordagens filogenéticas

As relações filogenéticas foram inferidas por Inferência Bayesiana (BI), aplicando-se o modelo HKY+G selecionado como o modelo de melhor ajuste de evolução de nucleotídeos por MEGA v.7.0.21. A análise de BI foi realizada no software MrBayes v.3.2.7.a implementado no portal CIPRES, com as análises realizadas executando duas execuções MCMC independentes de quatro cadeias para 10^8 gerações e topologias de árvore de amostragem a cada 10^2 gerações, os primeiros 25% das árvores foram descartadas como burnin e as árvores restantes usadas para calcular as probabilidades Bayesianas posteriores. A árvore obtida foi visualizada no FigTree v.1.4.3 e editadas no CorelDraw v.18. A divergência de nucleotídeos estimada a partir da distância entre os pares de *Bothrops* gr. *atrox* (Tabela 2), distância dentre (Tabela 3) e entre todos os grupos do gênero *Bothrops* (Tabela 4) foram calculadas no MEGA v.7.0.21, usando o modelo de parâmetro *P-distance* com 1000 réplicas de bootstrap (Kumar *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Tabela 1 - Sequências do gene RNA 12S, das espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus durissus* (outgroup), utilizados no estudo

Grupo / (No. de amostras)	Espécie	Código Genbank	Localidade	Referência
<i>B. gr. alternatus</i> (6)	<i>Bothrops alternatus</i>	EU867250.1; EU867251.1; AY223660.1; AY027777.1; MH697889.1	Brazil	(A); (B); (C); (D)
	<i>Bothrops itapetiningae</i>	EU867253.1	Brazil	(A)
<i>B. gr. atrox</i> (14)	<i>Bothrops asper</i>	AF057218.1; EU624239.1	NA; Costa Rica	(E); (F)
	<i>Bothrops atrox</i>	MH697890.1; MH697891.1; GQ428496.1; GQ428495.1; GQ428494.1; AY223659.1	Brazil; Ecuador; Suriname; NA	(B); (D); (G)
	<i>Bothrops leucurus</i>	MK060118.1; MK060119.1; MH697943.1; MH697942.1	Brazil	(H); (I)
	<i>Bothrops moojeni</i>	EU867256.1; EU867259.1	Brazil	(A)
<i>B. gr. jararaca</i> (3)	<i>Bothrops jararaca</i>	KX694583.1; EU867254.1	NA; Brazil	(A); (J)
	<i>Bothrops insularis</i>	AF057216.1	NA	(E)
<i>B. gr. jararacussu</i> (19)	<i>Bothrops brazili</i>	MN296324.1; MN296323.1; MN296326.1; MN296322.1; MN296325.1	Brazil	(I)
	<i>Bothrops jararacuçu</i>	MN296331.1; MN296330.1; MN296329.1	Brazil	(I)
	<i>Bothrops muriciensis</i>	MN296332.1; MN296333.1	Brazil	(I)
	<i>Bothrops osbornei</i>	KU999233.1; KU999232.1; KU999231.1; KU999234.1	Ecuador	(K)
	<i>Bothrops punctatus</i>	KU999239.1; KU999238.1; KU999235.1; KU999237.1; KU999236.1	Ecuador	(K)
<i>B. gr. microphthalmus</i> (2)	<i>Bothrops hyoprora</i>	AF057206.1	NA	(E)
	<i>Bothrops microphthalmus</i>	AY223657.1	NA	(B)
<i>B. gr. neuwiedi</i> (6)	<i>Bothrops diporus</i>	DQ305431.1	NA	(L)
	<i>Bothrops erythromelas</i>	AF057219.1; MH697937.1	NA; Brazil	(D); (E)
	<i>Bothrops lutzii</i>	MH697945.1; MH697944.1	Brazil	(D)
	<i>Bothrops pauloensis</i>	EU867260.1	NA	(A)
<i>B. gr. taeniatus</i> (9)	<i>Bothrops bilineatus</i>	MH697932.1; MH697931.1; MH697933.1; MH697934.1	Brazil	(D)
	<i>Bothrops chloromelas</i>	DQ305430.1	NA	(L)
	<i>Bothrops pulchra</i>	JN870179.1	Ecuador	(M)
	<i>Bothrops taeniatus</i>	MH697946.1; AF057215.1; KX694566.1	Brazil; NA	(D); (E); (J)
Grupo externo (1)	<i>Crotalus durissus</i>	AF259248.1	Venezuela; NA	(N)

REFERÊNCIAS: (A) Fenwick *et al.* (2009); (B) Parkinson; Campbell; Chippindale (2002); (C) Sineriz; Scrocchi; Abate (Unpublished); (D) Dal Vechio *et al.* (2018); (E) Parkinson (1999); (F) Wüster *et al.* (2008); (G) Malhorta *et al.* (2010); (H) Hamdan *et al.* (2019); (I) Dal Vechio *et al.* (2019); (J) Alencar *et al.* (2016); (K) Arteaga *et al.* (2016); (L) Castoe; Parkinson (2006); (M) Fenwick *et al.* (2012); (N) Murphy *et al.* (2002).

Tabela 2 - Distâncias entre os pares de bases do gênero *Bothrops* e *Crotalus durissus* (outgroup) - Gene 12S

Continuação. Tabela 2. Distância entre os pares de bases do gênero *Bothrops* e o *outgroup Crotalus durissus* – gene 12 S

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
16. <i>B. jararaca</i>	0.103	0.083	0.074	0.057	0.052	0.060	0.060	0.061	0.061	0.067	0.058	0.054	0.058	0.049	0.017							
17. <i>B. asper</i>	0.120	0.101	0.068	0.060	0.058	0.063	0.068	0.061	0.055	0.067	0.061	0.057	0.058	0.066	0.054	0.048						
18. <i>B. moojeni</i>	0.106	0.098	0.060	0.054	0.047	0.063	0.057	0.055	0.055	0.055	0.076	0.071	0.067	0.075	0.048	0.043	0.028					
19. <i>B. leucurus</i>	0.116	0.102	0.071	0.059	0.050	0.068	0.062	0.065	0.059	0.065	0.087	0.083	0.077	0.083	0.065	0.053	0.033	0.015				
20. <i>B. atrox</i>	0.120	0.109	0.077	0.071	0.064	0.080	0.074	0.064	0.064	0.067	0.088	0.083	0.085	0.089	0.066	0.060	0.046	0.017	0.027			
21. <i>B. aff. atrox</i> (Pl. Ibiapaba)	0.117	0.112	0.080	0.074	0.061	0.083	0.077	0.064	0.064	0.064	0.091	0.091	0.082	0.086	0.068	0.063	0.048	0.020	0.024	0.014		
22. <i>B. hyoprora</i>	0.123	0.083	0.088	0.071	0.070	0.077	0.074	0.076	0.076	0.081	0.091	0.086	0.082	0.086	0.063	0.057	0.068	0.063	0.074	0.071	0.074	
23. <i>B. microphthalmus</i>	0.117	0.080	0.080	0.051	0.061	0.060	0.054	0.081	0.081	0.070	0.088	0.083	0.070	0.089	0.063	0.051	0.066	0.060	0.065	0.071	0.074	0.040

Tabela 3 - Distância dentre os grupos do gênero *Bothrops* - gene 12S

Groups	Distance
<i>B. gr. atrox</i>	0.019
<i>B. gr. jararacuçu</i>	0.040
<i>B. gr. neuwiedi</i>	0.032
<i>B. gr. taeniata</i>	0.037
<i>B. gr. jararaca</i>	0.012
<i>B. gr. alternatus</i>	0.054
<i>B. gr. microphthalmus</i>	0.042

Tabela 4 - Distância entre os grupos do gênero *Bothrops* - gene 12S

Groups	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>B. gr. atrox</i>							
2. <i>B. gr. jararacuçu</i>	0.06						
3. <i>B. gr. neuwiedi</i>	0.08	0.09					
4. <i>B. gr. taeniata</i>	0.06	0.07	0.09				
5. <i>B. gr. jararaca</i>	0.06	0.07	0.06	0.06			
6. <i>B. gr. alternatus</i>	0.08	0.08	0.10	0.08	0.07		
7. <i>B. gr. microphthalmus</i>	0.07	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	
8. <i>Outgroup</i>	0,12	0,13	0,13	0,13	0,11	0,13	0,12

3.3 Amostragem morfológica

Para as comparações morfológicas das contagens de escamas, medições e observações categóricas, utilizamos o total de 64 exemplares de *Bothrops gr. atrox* depositados nas Coleções Herpetológicas da Universidade Federal do Ceará (CHUFC) e da Universidade Regional do Cariri (URCA-H) (Apêndice A). Tentamos contemplar somente as mais próximas do grupo *atrox* que foram obtidos sequenciamentos, que são: *B. asper*, *B. atrox*, *B. leucurus* e *B. moojeni*, conforme consta na Tabela 1. Entretanto, não obtivemos material de *B. asper* que pudéssemos incluir nas análises morfológicas. Das demais espécies (depositadas na CHUFC e URCA-H), vimos 35 adultos e 29 jovens, sendo: *Bothrops atrox* – 11 exemplares (três machos e duas fêmeas adultos; quatro machos e duas fêmeas jovens); *Bothrops leucurus* - 14 exemplares (quatro machos e cinco fêmeas adultos; três machos e duas fêmeas jovens); *Bothrops moojeni* – 11 exemplares (três machos e oito fêmeas adultos); e *Bothrops aff. atrox* (população do Planalto da Ibiapaba) - 28 espécimes (cinco machos e cinco fêmeas adultos; 18 jovens).

Fizemos as medições dos caracteres morfométricos com um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm e uma régua com precisão de 1 cm, fazendo com que as medições sejam relatadas em milímetros (mm) ou centímetros (cm), conforme indicado. Na descrição seguimos o padrão de simetria corporal, apresentando as contagens do lado esquerdo e direito nesta ordem (No. esq / No. dir) e determinamos o sexo pelo exame da presença ou ausência de hemipênis. Para a definição dos caracteres da morfologia externa seguimos Gutberlet e Campbell (2001) e Carrasco *et al.* (2012; 2019) e implementamos novas informações sobre a morfologia. Apresentamos e discutimos os dados da morfologia destes grupos e da série-tipo ao longo da descrição.

3.4 Análise morfológica merística

Na terminologia para contagens de escamas, seguimos Ferrarezzi e Freire (2001), porém acrescentamos as escamas Supralabiais (ESL), Infralabiais (EIL), Ventrais (EVE), Subcaudais (ESC) e número de manchas dorsolaterais em todo o corpo (MDL), além de incluir as nossas seguintes definições: as contagens das linhas Intersupraoculares (LIO) e as escamas cefálicas dorsais (EDC), na linha sagital, que iniciam logo após as Internasais e terminam no nível da região rictal; escamas dorsais anteriores (EDA) foram contadas no início (um comprimento de cabeça de distância), as dorsais medianas (EDM) na altura da metade do número das escamas ventrais, e as dorsais posteriores (EDP) no final (um comprimento de cabeça de distância da cloaca); consideramos a primeira ventral como a primeira escama mais larga do que longa; e

contamos as escamas entre a Subocular e a 4^a Supralabial em três níveis sob o olho: anterior (ES1), intermediário (ES2) e posterior (ES3).

Para verificar se haveria variação no número de escamas entre *B. aff. atrox* e as demais espécies analisadas, utilizamos uma análise de variação multivariada (MANOVA). Além disso, também realizamos uma análise de função discriminante (ADF), separadamente entre os sexos, para verificar se *B. aff. atrox* exibe agrupamento distinto das demais espécies analisadas, no morfo-espacô, sendo indicadas também as variáveis de maior variação entre as espécies. Realizamos todas as análises estatísticas no software R (R Development Core Team, 2019), com o valor de significância adotado de 5% (Zar, 2010).

3.5 Registro da nomenclatura e aspectos éticos

Os nomes científicos contidos nesse trabalho seguem a Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN). Portanto, caso sejam registrados futuramente novos nomes, serão efetivamente aplicados sob as normas do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, com base na 4^a. edição, disponível em <https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/the-code-online/>, além da realização do registro *on line* no ZooBank.

4 RESULTADOS

4.1. A população de *Bothrops aff. atrox* do Planalto da Ibiapaba-CE

Até o momento, essa população de serpentes é conhecida apenas para o Parque Nacional de Ubajara e área do entorno, em florestas de média altitude, entre 475 a 845 m (Figura 1). Os chamados Brejos de Altitude são áreas isoladas, enclaves da floresta tropical localizadas nas encostas, no topo e/ou no sopé de áreas de maior altitude, como Maciço de Baturité, Serras de Maranguape e Pacatuba, Planalto da Ibiapaba e a Chapada do Araripe, localizados no nordeste do Brasil (Borges-Nojosa; Caramaschi, 2003). Embora cobertas por floresta tropical úmida, estão localizadas em plena depressão sertaneja, circundadas por vegetação semiárida da Caatinga (Ab'Sáber, 1977). Os brejos de altitude do Ceará destacam-se pela biodiversidade endêmica, com impactos nas descrições e constatação de novas espécies como os lagartos *Leposoma baturitensis* Rodrigues e Borges, 1997 e *Placosoma limaverdorum* Borges-Nojosa, Caramaschi e Rodrigues, 2016, as serpentes *Atractus ronnie* Passos, Fernandes e Borges-Nojosa, 2007 e *Apostolepis thalesdelemai* Borges-Nojosa, Lima, Bezerra e Harris, 2015, os anfíbios *Adelophryne baturitensis* e *A. maranguapensis* Hoogmoed, Borges e Cascon, 1994, *Rhinella casconi* Roberto, Brito e Thomé, 2014 e *Proceratophrys ararype* Mângia, Koroiva, Nunes, Roberto, Ávila, Sant'Anna, Santana e Garda, 2018 (Borges-Nojosa *et al.*, 2016; Roberto; Loebmann, 2016; Castro *et al.* 2019; Borges-Nojosa; Ávila; Cassiano-Lima, 2021), além de grupos de crustáceos como *Kingsleya attenboroughi* Pinheiro e Santana, 2016 e *Fredius ibiapaba* Santos, Tavares, Silva Jr., Cervini, Pinheiro e Santana, 2020 (Pinheiro; Santana, 2016; Santos *et al.*, 2020).

4.1.1 Dados da espécie

A espécie foi coletada em diferentes habitats, inclusive em locais abertos próximos a moradias dentro do Parque Nacional de Ubajara. Entretanto, apresenta comportamento calmo, não sendo relatados casos de acidentes ofídicos.

Figura 1 - Vista do Parque Nacional de Ubajara: A- Vista da paisagem e relevo; B- Detalhe da vegetação; C- Formações rochosas que abrigam as grutas



Fotos: D.M. Borges-Nojosa.

A coloração em vida (Figuras 2 e 3) mostra o dorso da cabeça uniformemente marrom, com um par de manchas parietais pretas alongadas, seguidas por estrias paralelas claras nas bordas internas, posicionadas na nuca. Lateralmente observa-se uma faixa pós-ocular uniformemente marrom escura, que inicia em contato com o olho, cobrindo parcialmente as duas últimas escamas supralabiais e infralabiais. A cor de fundo do corpo é marrom claro, variando até cor de canela. Ao longo de cada lado do corpo conta-se 18 manchas dorsolaterais,

pretas com bordas marrons esbranquiçadas, em forma de ampulheta. A superfície ventral do corpo apresenta um padrão xadrez e da cauda marrom escura. Filhotes apresentam a ponta da cauda sem coloração, com coloração esbranquiçada.

Figura 2 - Exemplar adulto de *Bothrops aff. atrox*, com detalhe da coloração natural da espécie



Foto: D.M. Borges-Nojosa

Figura 3 - Indivíduo jovem de *Bothrops aff. atrox*



Foto: R.W. Ávila.

4.1.2 Dados morfométricos e merísticos

Localizamos 28 exemplares (Apêndice A), entre adultos (10) e jovens (18), e levantamos os dados morfométricos e merísticos (Tabelas 5, 6 e 7) com a finalidade de comparar com as espécies do grupo *Bothrops* gr. *atrox*, exceto *B. asper*.

Observa-se que de forma geral, pela morfologia externa, *Bohtrops aff. atrox* pode ser diferenciada das demais espécies do gênero pela presença da borda anterior da fosseta loreal (ou escama lacunolabial) fundida com a 2^a supralabial, pelo padrão das manchas dorsais ao longo do corpo, com manchas indefinidas (é em forma de C, ou “gancho de telefone” em outras espécies). Quanto ao *Bothrops* gr. *atrox*, grupo filogenético que a nova espécie provavelmente estará inserida devido à proximidade com *B. atrox*, distingue-se pelas seguintes características: difere de *B. atrox* por possuir a parte superior das manchas dorsolaterais subtriangulares, em forma de ampulheta e irregulares em largura, sem tendências a formar faixas (parte superior das manchas dorsolaterais com tendências a formar faixas, regulares em largura em formato retangular); de *B. moojeni*, por apresentar o ventre com padrão em xadrez (ventre claro ou salpicado de escuro); de *B. leucurus* pelas supralabiais salpicadas, chegando quase a pretos nos jovens (supralabiais claras e as gulares escuras); de *B. moojeni* e *B. leucurus*, pela coloração clara das escamas gulares e sem manchas (coloração escura e com manchas salpicadas); entretanto assemelha-se pelo padrão de cor e marcas da cabeça a *B. moojeni* por apresentar um par de manchas parietais pretas e duas estrias occipitais paralelas claras que cobrem a nuca; e a *B. atrox* e *B. leucurus* quanto à forma xadrezada do ventre.

Tabela 5 - Dados morfométricos dos exemplares adultos de *Bothrops aff. atrox*

Caracteres	Amostra	
	Macho (N=5)	Fêmea (N=5)
Sulco mental	7.77-12.42	3.01-18.6
Tamanho das cantais	2.13-7.26	1.7-5.32
Comprimento da cauda	76.1-278.21	130.85-172.5
Comprimento rosto cloacal (cm)	17-117.3	78.4-107.9
Distância internasal	4.63-9.08	6.06-8.2
Largura no meio da cabeça	18.29-33.92	9.29-35.45
Distância interorbital	9.2-25.96	7.28-18.2
Comprimento da cabeça	26.32-53.38	18.61-49.08
Distância entre o olho e a fosseta	2.03-4.32	2.61-4.35
Distância entre o olho e a extremidade anterior da cabeça	7.46-16.01	10.45-14.86

Tabela 6 - Dados merísticos dos exemplares adultos de *Bothrops aff. atrox*

Caracteres	Amostra	
	Macho (N=5)	Fêmea (N=5)
Nº Esc. Subcaudais	55-70	59-64
Nº Esc. Ventrais	188-198	191-200
Nº Esc. Intersupraocular	5-8	6-8
Nº Esc. Internasais	0-2	0-1
Nº Esc. em contato com Supraoculares	7-14	11-13
Nº Esc. Supralabiais Dir./Esq.	7-8/7-8	7-8/7
Nº Esc. Infralabiais Dir./Esq.	8-12/9-11	9-10/9-10
Nº Esc. em contato com as cantais	8-9	7-8
Nº de fileira entre Cantal-supraocular	1	1
Nº manchas dorsolaterais até cloaca	16-20	17-20
Nº Esc. 1ª Linha de Cantais	3-6	3-5
Nº Esc. 2ª Linha de Cantais	3-6	4-6
Faixa de Gulares entre 1º Ventral e Infralabiais	4-6	5-6
Nº Esc. Infralabiais que tocam genial	3	3
No. Esc. Préfoveais	1-3	1-3
Espaço mínimo entre as manchas dorsolaterais	3-8	4-7
Nº Esc. Suboculares	1-2	1-2
Nº Esc. Interoculabiais entre suboculares e 3º e 4º Supralabiais	3-6	4-6
Nº Esc. Interoculabiais entre suboculares e 4º Supralabial	3-5	3-5
Nº Esc. Interoculabiais entre suboculares e 4º e 5º Supralabial	4-8	5-9
Nº Esc. Dorsais Cefálicas (focinho ao pescoço)	24-32	24-35
Nº Esc. Gulares	4-5	3-4
Nº Esc. Dorsais Anteriores	25-27	25-27
Nº Esc Dorsais Medianas	25-27	25-27
Nº Esc. Dorsais Posteriores	21	21
Margem inferior da mancha dorsolateral	5-9	5-8
Margem superior da mancha dorsolateral	2-4	1-3
Altura da mancha dorsolateral média	5-8	5-7
Nº Esc. Pósfoveal	2-3	2-3
Nº Esc. Supralabiais invadindo Faixa Orbital	2	1-3

Tabela 7 - Dados de folidose dos exemplares adultos e jovens de *Bothrops aff. atrox*

Caracteres	Macho		Fêmea	
	Adultos N=5	Jovens N= 13	Adultas N= 4	Jovens N= 5
Forma da internasal	Alon	Alon	Alon	Along
Marcações ventrais	Xadr	Xadr	Xadr	Xadr
Coloração das gulares	Bca.	Esc	Bca	Esc
Parte superior das manchas dorsolaterais	Subt	Subtr	Subtr	Subtr
Manchas nas gulares	Aus	Salp	Aus	Salp
Manchas das supralabiais	Salp	Salp	Salp	Salp
Forma da loreal	Trap	Trap	Trap	Trap
Forma das Intersupraoculares	Lis/Qui	Qui	Qui	Qui
Internasais (contato ou separada)	Sepa/Cont	Cont/Sepa	Sepa	Cont/Sepa
Intersupra oculares fusionadas	Pres	Pres	Pres	Pres
Margem superior da mancha dorsolateral regulares em largura	N	N	N	N
Formato da faixa dorsolateral	Ampu	Ampu	Ampu	Ampu

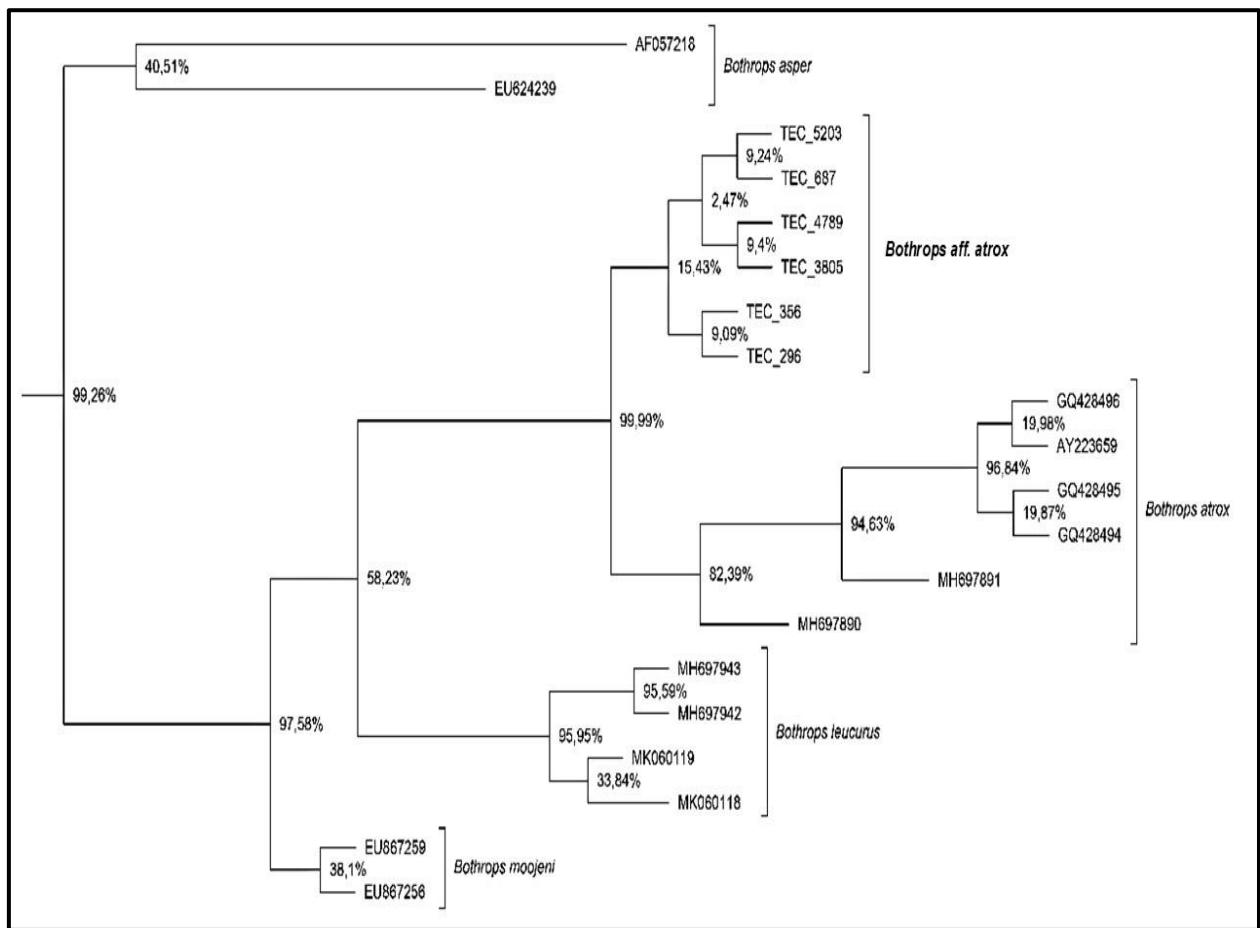
LEGENDA: Alon.=Alongada; Retan.=Retangular; Trian.=Triangular; Subtr.=Subtriangular; Trap.=Trapezóide; Pent.=Pentagonal; Quad.=Quadrículada; Xadr.=Forma de xadrez; Salp.=Salpicada; Bca.=Brancas; Esc.=Escuras; Lis.=Lisas; Qui.=Quilhadas; Pres.=Presente; Aus.=Ausente; Difu.=Difusas; Ampu.=Ampulheta; List.=Listras; Cont.=Em contato; Sepa.=Separadas

4.2 Análise molecular

Através dos dados da análise de Inferência Bayesiana (gene 354 bp 12S rRNA), construímos uma árvore filogenética (Figura 4) que sugere, com exceção de *Bothrops atrox*, que todas as espécies do grupo usado no estudo são linhagens independentes, incluindo *Bothrops aff. atrox*, da população do Planalto da Ibiapaba. Todas as linhagens dentro do grupo aparentemente são monofiléticas.

As relações dentro do grupo posicionam *Bothrops aff. atrox* mais próxima filogeneticamente de *Bothrops atrox*, com uma distância-*p* não corrigida de 1,014 % (Tabela 2), sendo uma distância genética baixa, comum entre as espécies da família Viperidae (Puerto *et al.*, 2001; Carrasco *et al.* 2019; Carbajal-Márquez *et al.* 2020). No entanto, *Bothrops aff. atrox* é recuperada com 100% de probabilidade posterior. À distância-*p* não corrigida geral é baixa, variando de 1,4 % a 4,8 % entre as espécies do *B. gr. atrox* (Tabela 3 e 4).

Figura 4 - Árvore filogenética recuperando os diversos grupos de *Bothrops gr. atrox*, com posicionamento de *Bothrops aff. atrox* da população do Planalto da Ibiapaba – Ceará



Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

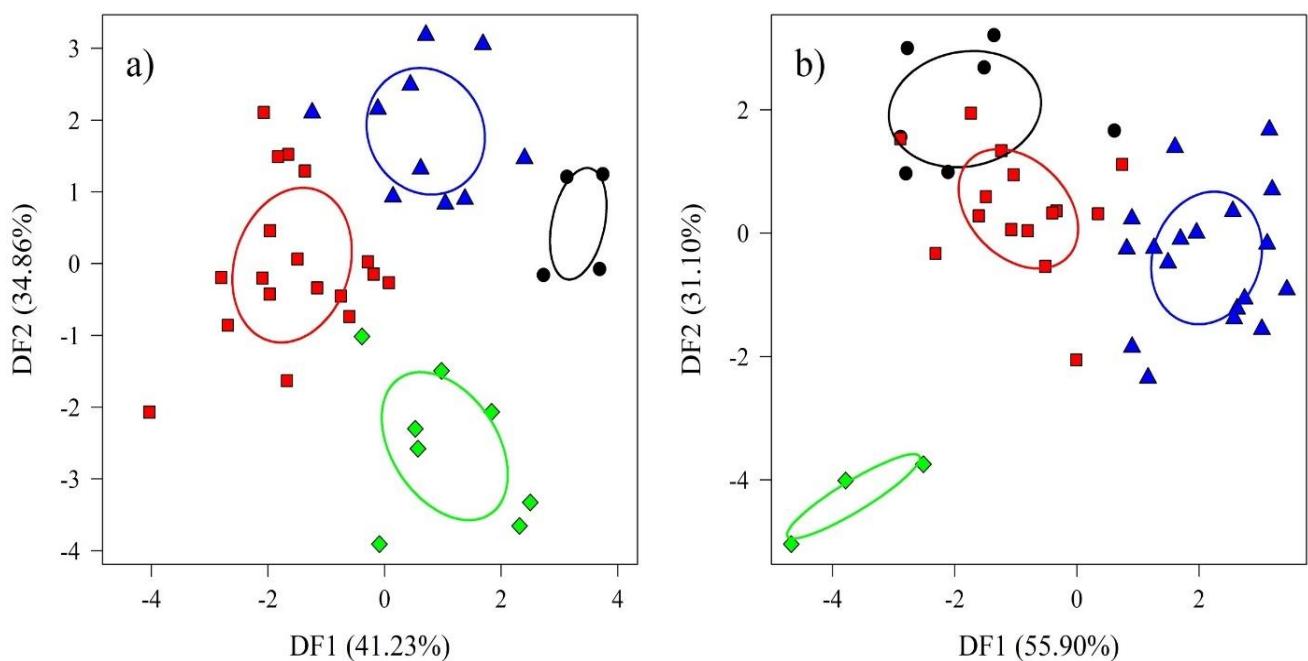
4.3 Análise morfológica

As variáveis morfológicas, merísticas e de folidose variaram entre as três espécies (*B. atrox*, *B. leucurus*, *B. moojeni*) (Tabelas 8, 9 e 10) e *B. aff. atrox*, sendo observado agrupamento distinto entre a população do Planalto da Ibiapaba e as demais espécies de *Bothrops gr. atrox* analisadas (Figura 5).

Além disso, dentro de *Bothrops aff. atrox* houve variações para fêmeas ($df = 3$; Pillai = 2.072; $F = 2.121$; $p < 0.05$) e os machos ($df = 3$; Pillai = 1.981; $F = 2.138$; $p < 0.05$). As variações ocorreram também nas contagens das escamas intersupraoculares, escamas internasais, primeira e segunda linha de escamas intercantais, número de escamas interocularial entre a quarta supralabial e número de supralabiais invadindo a faixa occipital entre as fêmeas; e nos machos foi observada variação no número de escamas ventrais, escamas intersupraoculares, escamas internasais, número de manchas dorsolaterais até a cloaca, escamas interocularial entre a quarta supralabial, contagem das escamas diagonal no meio do corpo e na parte posterior, e número de supralabiais invadindo a faixa occipital.

No biplot da AFD foi observado agrupamento distinto entre as quatro espécies, tanto para fêmeas quanto para machos (Figura 5). Para as fêmeas, o primeiro eixo da AFD explicou 41,23% da variação de contagem de escamas, distinguindo *B. aff. atrox* de *B. atrox* e *B. leucurus*. No segundo eixo, as fêmeas de *B. aff. atrox* foram agrupadas no extremo positivo, indicando distinção das espécies restantes, com uma explicação de 34,68% (Figura 5-a), totalizando uma explicação de 76,09% da variação da contagem de escamas paras as escamas. Para os machos, o primeiro eixo da AFD distinguiu *B. aff. atrox* das demais espécies do estudo com uma explicação de 55,90% (Figura 5-b), no segundo eixo a AFD explicou 31,10% da variação entre as espécies, distinguindo os machos de *B. aff. atrox* das demais espécies com uma explicação total de 87% da variação de contagem de escamas.

Figura 5 - Biplot da AFD: *Bothrops atrox* (preto), *Bothrops leucurus* (vermelho), *Bothrops moojeni* (verde) e *Bothrops aff. atrox*. (azul); AFD (a) – fêmeas e AFD (b) - machos



Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

Tabela 8 - Dados morfométricos e merísticos dos machos e fêmeas adultos de espécies do *Bothrops* gr. *atrox*

Caracteres	<i>B. atrox</i>		<i>B. leucurus</i>		<i>B. moojeni</i>	
	Machos N=3	Fêmeas N=2	Machos N=4	Fêmeas N=5	Machos N=3	Fêmeas N=8
Nº Esc. Subcaudais	53-73	60-71	60-67	60-62	55-62	57-68
Nº Esc. Ventrais	192-204	193-199	194-197	188-199	192-200	154-205
Nº Esc. Intersupraocular	5-9	6-7	7	6-9	8-9	7-11
Nº Esc. Internasais	0	0	0-1	0-1	0-2	0-2
Nº Esc. em contato com Supraoculares	11-12	11-13	10-12	10-12	12-13	11-13
Nº Esc. Supralabiais Dir./Esq.	7-8/7	7/7	7/7-8	7/7	7-8/7	7/7
Nº Esc. Infralabiais Dir./Esq.	9-10/10	9-10/9-10	9-11/9-11	9-10/9-10	10/10	9-10/9-10
Nº Esc. Em contato com as cantais	7-9	7-8	7-8	7-8	8	7-8
Nº de fileira entre Cantal-supraocular	0-1	0-1	1-2	1-2	1	1
Nº manchas dorsolaterais até cloaca	16-20	18-20	17-19	17-19	15-17	15-20
Nº Esc. 1ª Linha de Cantais	3-4	3-4	4-5	3-5	4-5	4-5
Nº Esc. 1ª Linha de Cantais	3-5	4-5	5	4-6	5-6	5
Faixa de Gulares entre 1º Ventral e Infralabiais	5	5	5-6	4-6	6	5
Nº Esc. Infralabiais que tocam genial	2-3	3	3	3	3	3
Nº Esc. Préfoveais	1-3	1-2	2-3	1-3	2	1-2
Espaço mínimo entre as manchas dorsolaterais	4-6	5-6	5-7	5	4-5	4-7
Nº Esc. Suboculares	1-3	1-3	1	1	1	1-3
Nº Esc. Interoculabiais entre suboculares e 3º e 4º Supralabiais	4-7	4-6	3-6	4-5	5-8	4-8
Nº Esc. Interoculabiais entre suboculares e 4º Supralabial	2-6	3-5	2-5	3-4	4-7	3-6
Nº Esc. Interoculabiais entre suboculares e 4º 5º Supralabial	5-9	5-7	6-9	5-9	6-10	5-11
Nº Esc. Dorsais Cefálicas (focinho ao pescoço)	24-29	23-29	24-31	24-29	28-30	27-30
Nº Esc. Gulares	3-5	3-4	3-5	3-5	4	3-4
Nº Esc. Dorsais Anteriores	23-25-27	23-35-27	25	25-27	23-25-27	25-27
Nº Esc Dorsais Medianas	23-25	25	25	25-27	27-25	23-25-27
Nº Esc. Dorsais Posteriores	19-21	19-21	19-21	19-21	21	19-21
Margem inferior da mancha dorsolateral	4-8	5-7	5-8	6-8	6-8	6-8
Margem superior da mancha dorsolateral	2-4	3-5	4	2-4	2-3	3-4
Altura da mancha dorsolateral média	6-7	5-6	6	5-7	6-7	6
Nº Esc. Pósfoveal	2	2	2	2	2	2
Nº Esc. Supralabiais invadindo Faixa Orbital	2-3	2-3	2-3	2-3	1-2	1-2

Tabela 9 - Dados merísticos dos machos e fêmeas adultos de espécies de *Bothrops* gr. *atrox*

Caracteres	<i>B. atrox</i>		<i>B. leucurus</i>		<i>B. moojeni</i>	
	Machos N=3	Fêmeas N=2	Machos N=4	Fêmeas N=5	Machos N=3	Fêmeas N=8
Sulco mental	7.67-7.63	9.37-14.22	7.84	5.87-13.18	7.55-9.92	9.28-18.69
Tamanho das Cantais	3.26-4.67	3.33-3.51	3.03	2.38-3.86	1.9-4.29	3.02-5.39
Comprimento da cauda	12-156.75	14-55.42	85.12	74.21-127.2	60.93-9.8	107.96-158.07
Comprimento rosto-cloacal (cm)	65-100.6	72-76.8	52.7	51.2-89.4	43.8-79.8	64.6-112.8
Distância Internasal	4.2-7.13	5.35-6.46	4.42	3.92-6.18	3.97-4.8	6.23-9.23
Largura no meio da cabeça	14.56-31.75	18.84-19.74	12.38	16.51-22.21	14.96-18.99	18.79-33.4
Distância Interorbital	10.54-17.01	12.49-12.81	9.56	9.94-14.03	10.21-14.82	12.04-19.16
Comprimento da cabeça	26.93-44.38	31.73-32.08	26.13	24.28-39.21	25.23-34.09	30.23-49.69
Distância entre o olho e fosseta	2.18-3.89	2.52-2.62	1.94	2.03-3.32	1.8-2.69	1.98-4.31
Distância entre o olho e extremidade anterior da cabeça	8.76-12.85	9.66-10.77	9.01	7.75-11.28	7.5-10.77	9.48-15.89

Tabela 10 - Dados da folidose de machos e fêmeas, adultos e jovens de espécies de *Bothrops* gr. *atrox*

Caracteres	<i>B. atrox</i>		<i>B. leucurus</i>		<i>B. moojeni</i>	
	Machos N=3	Fêmeas N=2	Machos N=4	Fêmeas N=5	Machos N=3	Fêmeas N=8
Adultos						
Forma da Internasal	Alon/Subtr	Alon	Alon	Alon/Subtr	Alon	Alon
Marcações ventrais	Xadr	Xadr	Xadr	Xadr/Salp	Salp	Salp
Coloração das Gulares	Bca/Esc	Bca/Esc	Esc	Bca/Esc	Esc	Bca
Parte superior das manchas Dorsolaterais	Retan	Retan/Subtr	Subtr	Subtr	Subtr	Subtr/Trian
Manchas nas Gulares	Difu/Aus	Difu/Aus	Salp	Salp/Aus	Salp	Salp/Aus
Manchas das Supralabiais	Esc/Salp	List/Salp	List	List/Salp	Salp	Salp
Forma da Loreal	Trap/Pent/Quad	Pent/Quad	Trap	Trap	Trap	Trap
Forma das Intersupraoculares	Lis/Qui	Qui	Qui	Qui	Lis/Qui	Qui
Internasais em contato ou separada	Cont	Cont	Sepa	Cont/Sepa	Cont/Sepa	Cont/Sepa
Intersupra Oculares fusionadas	Aus/Pres	Pres	Pres	Pres/Aus	Aus	Aus
Largura da margem superior da mancha Dorsolateral	S	S	N	N	N	N
Formato da faixa dorsolateral	Retan	Retan	Ampu	Ampu	Ampu	Ampu
Jovens	N= 4	N= 2	N= 3	N= 2	N= 0	N= 0
Forma da internasal	Alon/Subtr	Subtr	Alon	Alon	---	---
Marcações ventrais	Xadr/Salp	Xadr	Xadr	Xadr	---	---
Coloração das gulares	Esc	Esc	Esc	Esc	---	---
Parte superior das manchas dorsolaterais	Subtr/Retan	Subtr/Trian	Subtr	Subtr	---	---
Manchas nas gulares	Difu	Difu	Salp/Difu	Difu	---	---
Manchas das supralabiais	Salp/Esc/List	Salp/Esc	List	List	---	---
Forma da loreal	Pent	Pent	Trap	Trap	---	---
Forma das Intersupraoculares	Qui/Lis	Lis	Qui/Lis	Qui	---	---
Internasais em contato ou separada	Cont	Cont	Cont	Sepa	---	---
Intersupra oculares fusionadas	Aus/Pres	Pres	Pres	Aus/Pres	---	---
Largura da margem superior da mancha dorsolateral	N/S	N	N	N	---	---
Formato da faixa dorsolateral	Ampu/Retan	Ampu	Ampu	Ampu	---	---

LEGENDA: Alon.=Alongada; Retan.=Retangular; Trian.=Triangular; Subtr.=Subtriangular; Trap.=Trapezóide; Pent.=Pentagonal; Quad.=Quadrículada; Xadr.=Forma de xadrez; Salp.=Salpicada; Bca.=Branca; Esc.=Escuras; Lis.=Lisas; Qui.=Quilhadas; Pres.=Presente; Aus.=Ausente; Difu.=Difusas; Ampu.=Ampulheta; List.=Listras; Cont.=Em contato; Sepa.=Separadas.

5 DISCUSSÃO

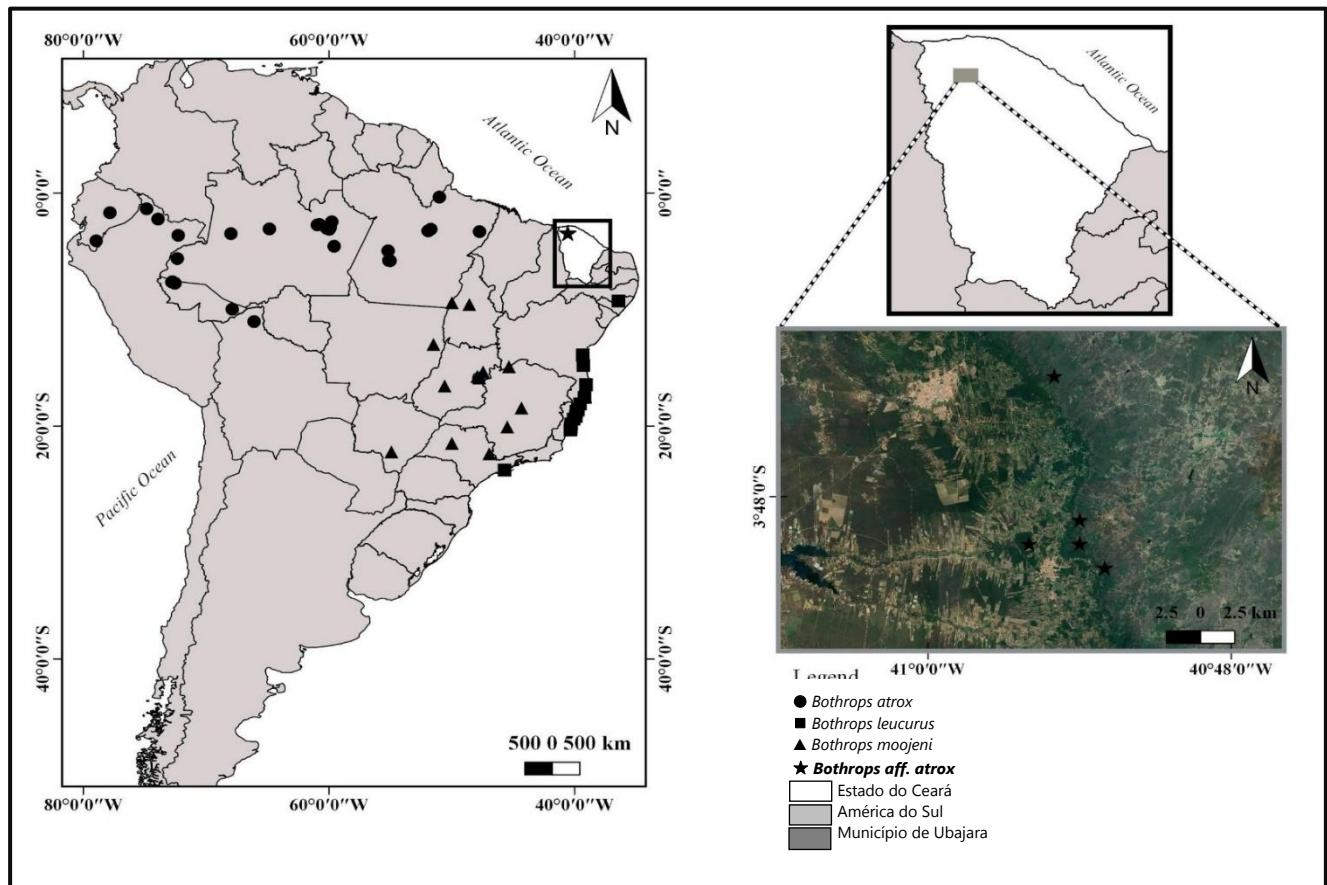
O continente sulamericano se destaca em relação a sua biodiversidade (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012), e os estudos com taxonomia integrativa tem-se destacado nos esforços para o reconhecimento dessa diversificação biológica, principalmente empregando a biologia molecular usando DNA, que tem como resultado o sucesso na descoberta de espécies crípticas (Witt *et al.*, 2006; Kadarusman *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017).

O gênero *Bothrops* se destaca pela sua diversidade e sistemática complexa. Assim, por se tratar de um grupo parafilético, tem-se buscado definir sua monofilia, seja criando novos gêneros, sinonimizando ou invalidando outros (Gutberlet; Campbell, 2001; Wüster *et al.*, 2002; Fenwick *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2012; Zaher *et al.*, 2019). *Bothrops* gr. *atrox* aparenta ser um complexo taxonômico parafilético, sendo composto por pelo menos quatro espécies principais bem definidas (*Bothrops asper*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops leucurus* e *Bothrops atrox*): *Bothrops asper*, espécie que apresenta um longo histórico de mudança taxonômica, é amplamente distribuído no noroeste da América do Sul, sendo a única espécie do gênero *Bothrops* conhecida na América Central (Alape-Girón *et al.*, 2009; Saldarriaga-Córdoba *et al.*, 2017). Porém, é provável que o Panamá e Costa Rica tenham mais de uma espécie; *Bothrops moojeni* é conhecido como um clado monofilético dentro do complexo taxonômico *Bothrops* gr. *atrox*, com distribuição no Centro e Sudeste do Cerrado do Brasil (Borges; Araújo, 1998; Campbell; Lamar, 1989; Leloup, 1984; Nogueira *et al.*, 2003); *Bothrops leucurus* também é uma espécie monofilética com distribuição restrita a Mata Atlântica da região nordeste do Brasil (Porto; Teixeira, 1995; Melgarejo, 2003; Lira-da-Silva, 2009); e *Bothrops atrox* tem ampla distribuição, ocorre em países da América do Sul como Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Venezuela, Brasil (Pará, Acre etc.), Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Trinidad (Wüster *et al.*, 1996; Campbell; Lamar, 2004). Devido às incertezas taxonômicas envolvendo *Bothrops atrox*, sinônimos já foram propostos desde quando Linnaeus (1758) a descreveu, como *Coluber atrox*. É desconhecido o local específico do holótipo, mas provavelmente tenha sido coletado no Suriname.

A ampla distribuição geográfica de *B. atrox*, com casos mais distantes do corpo da Floresta Amazônica, registradas nas bordas (p.e. os registros no Maranhão, no Paraguai e até no Ecuador) (Figura 6), além dos casos de populações isoladas, fortalecem a hipótese de *Bothrops atrox* ser um táxon *incerto*, sendo provável que se trate de um complexo, com várias espécies novas ainda a descobrir. Nossos resultados reforçam a hipótese de *Bothrops* gr. *atrox*

ser um complexo taxonômico, com várias espécies candidatas a serem descritas. Entretanto, parte da instabilidade percebida na Figura 1 também pode ter como base a necessidade de incluir maior número de representantes nas análises biomoleculares.

Figura 6 - Distribuição no Brasil das espécies do *Bothrops* gr. *atrox*, com destaque para *Bothrops* aff. *atrox*



Fonte: mapa elaborado pela pesquisadora com base nos dados do SpeciesLink

Por outro lado, a população isolada de *Bothrops aff. atrox* presente no noroeste do estado do Ceará, no Planalto da Ibiapaba, aparece no cladograma (Figura 4) e pela morfologia (Figura 5) como um táxon bem distinto, pertencente ao *B. gr. atrox*, porém com bom suporte de isolamento, nos possibilitando confirmar o *status taxonômico*, tanto pela biologia molecular como pelas análises morfológicas, que compõe um novo táxon, a ser descrito cientificamente muito em breve. E por se tratar de uma população isolada que foi anteriormente identificada como *B. atrox*, reforça ainda que de fato *Bothrops gr. atrox* trata-se de um complexo taxonômico que precisa ser amplamente revisado sistematicamente.

Por fim, outra questão relativa à população de *Bothrops aff. atrox* diz respeito às possíveis variações morfológicas sexuais. Observamos dimorfismo sexual comprovado pelas análises de variação multivariada (MANOVA) e de função discriminante (ADF) (Figura 5), bem como nas demais espécies do grupo. Morfologicamente, as variações estão ligadas às 1º e 2º linha de Intercantais (em contato com as cantais 8 – 9 nos machos; 7 – 8 nas fêmeas), às Intersupraoculares (em contato com as supraoculares 7 – 14 nos machos; 11 – 13 nas fêmeas), às escamas ventrais (188 – 198 nos machos; 191 – 200 nas fêmeas) e às Subcaudais (55 – 70 nos machos; 59 – 64 nas fêmeas).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados respondem à questão inicial, visto que apontam para a existência de um novo táxon para *Bothrops aff. atrox*, no qual, embora filogeneticamente seja muito próximo de *B. atrox* e compartilhe caracteres morfológicos semelhantes aos outros exemplares do grupo taxonômico, se trata de uma nova espécie críptica endêmica de um Brejo de altitude do Ceará. Ou seja, corrobora a hipótese H(1) de que a população isolada presente no Planalto da Ibiapaba, já passou pelo processo evolutivo de especiação por quebra da população e isolamento genético e representa uma linhagem monofilética independente dentro do *Bothrops gr. atrox*.

Além disso, o uso em conjunto de ferramentas diferentes, utilizando a biologia molecular e a morfologia externa foram complementares e suficientes para nos auxiliarem na compreensão da linhagem e delimitação do *status* taxonômico. No entanto, maiores amostragens morfológicas e moleculares, além da utilização de novos métodos, podem ser necessárias para elucidar as relações existentes entre as espécies do *Bothrops gr. atrox*.

A hipótese H(0), que este táxon representa um novo elemento que apoia conexões pretéritas entre as matas úmidas do nordeste brasileiro e Amazônia também pode ser corroborado e reforça a necessidade de integrar diferentes fontes de dados para investigar a diversidade dentro do gênero *Bothrops*. Além disso, estudos sobre aspectos filogeográficos e biogeográficos são recomendados para compreender os processos que guiaram os padrões evolutivos e a distribuição em *Bothrops*.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 52, p. 1 – 22, 1977.
- AGUILAR, C.; WOOD, P.; CUSI, J. C.; GUZMÁN, A.; HUARI, F.; LUNDBERG, M.; MORTENSEN, E.; RAMÍREZ, C.; ROBLES, D.; SUÁREZ, J.; TICONA, A.; VARGAS, V.; VENEGAS, P. J.; SITES, J. Integrative taxonomy and preliminary assessment of species limits in the *Liolaemus walker* complex (Squamata, Liolaemidae) with descriptions of three new species from Peru. **ZooKeys**, v. 91, p. 47 – 91, 2013.
- ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DIAZ, M.; SANZ, L.; MADRIGAL, M.; ESCOLANO, J.; SASA M.; CALVETE, J. J. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. **Toxicon**, v. 54, n. 37, p. 938-948, 2009.
- ALENCAR, L. R.; QUENTAL, T. B.; GRAZZIOTIN, F. G.; ALFARO, M. L.; MARTINS, M.; VENZON, M.; ZAHER, H. Diversification in vipers: phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 105, n. 2016, p. 50-62, 2016.
- ANDRADE-LIMA, D. Presente day forest refuges in Northeastern Brazil. In: PRANCE, G. T. (Ed.). **Biological diversification in the tropics**. New York: Columbia University Press, p. 1982. p. 245-254.
- ARTEAGA, A.; PYRON, R. A.; PENAFIEL, N.; ROMERO-BARRETO, P.; CULEBRAS, J.; BUSTAMANTE, L.; YANEZ-MUNOZ, M. H.; GUAYASAMIN, J. M. Comparative phylogeography reveals cryptic diversity and repeated patterns of cladogenesis for amphibians and reptiles in Northwestern Ecuador. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1- 40, e0151746, 2016.
- BORGES, R. C.; ARAÚJO, A. F. B. Seleção de habitat em duas espécies de Jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 591 – 601, 1998.
- BORGES-NOJOSA, D. M. Diversidade de Anfíbios e Répteis da Serra de Baturité, Ceará. In: OLIVEIRA, T. S.; ARAÚJO, F. S. (Eds.), **Diversidade e Conservação da Biota na Serra de Baturité, Ceará**. Fortaleza: Editora UFC, 2007. p. 225–247.
- BORGES-NOJOSA, D. M.; ÁVILA, R. W.; CASSIANO-LIMA, 2021. **Lista de espécies de répteis do Estado do Ceará**. Disponível em: <https://www.sema.ce.gov.br/fauna-do-ceara/repteis/>. Acesso em: 26.fev. 2021.
- BORGES-NOJOSA, D. M.; CARAMASCHI, U. Composição e análise comparativa da diversidade e das afinidades biogeográficas dos lagartos e anfíbios (Squamata) dos Brejos Nordestinos. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.), **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora UFPE, 2003. p. 489-540.
- BORGES-NOJOSA, D. M.; CARAMASCHI, U.; RODRIGUES, M. T. A new species of lizard *Placosoma* Tschudi, 1847 (Squamata: Gymnophthalmidae) from the relictual forest mountains of the State of Ceará, Brazil. **Zootaxa**, v. 4169, n. 1, p. 160 – 170, 2016.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of Latin America. The Venomous Reptiles of Latin America.** Ithaca, NY: Cornell University Press, 425 p, 1989.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.** Ithaca, NY: Cornell University Press, 870 p, 2004.

CARBAJAL-MÁRQUEZ, R. A.; CEDEÑO-VÁZQUEZ, J. R.; MARTÍNEZ-ARCE, A.; NERI-CASTRO, E.; MACHKOUR-M'RABET, S., 2020. Accessing cryptic diversity in Neotropical rattlesnakes (Serpentes: Viperidae: *Crotalus*) with the description of two new species. **Zootaxa**, v. 4729, n. 4, p. 451 – 481, 2020.

CARRASCO, P. A.; GRAZZIOTIN, F. G.; FARFAN, R. S. C.; KOCH, C.; OCHOA, J. A.; SCROCCHI, G. J.; LEYNAUD, G. C.; CHAPARRO, J. C. A new species of *Bothrops* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) from Pampas del Heath, southeastern Peru, with comments on the systematics of the *Bothrops neuwiedi* species group. **Zootaxa**, v. 4565, n. 3, p. 301–344, 2019.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 2, p. 109–124, 2012.

CARVALHO, J. A. **Diversidades de Serpentes do Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito, Lavras, MG.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2006.

CASTOE, T. A.; PARKINSON, C. L. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 39, n. 1, p. 91-110, 2006.

CASTRO, D. P.; MÂNGIA, S.; MAGALHÃES, F. M.; RÖHR, D. L.; CAMURUGI, F.; SILVEIRA-FILHO, R. R.; SILVA, M. M. X.; ANDRADE-OLIVEIRA, J. A.; SOUSA, T. A.; FRANÇA, F. G. R.; HARRIS, D. J.; GARDA, A. A.; BORGES-NOJOSA, D. M. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga VI: the Ubajara National Park, Ceará, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 12, n. 2019, p. 727 – 742, 2019.

DAL VECHIO, F.; PRATES, I., GRAZZIOTIN, F. G.; ZAHER, H.; GRABOSKI, R.; RODRIGUES, M. T. Rainforest shifts through time and riverine barriers shaped the diversification of South American terrestrial pit vipers (*Bothrops jararacussu* species group). **Journal of Biogeography**, v. 47, n. 1, p. 1 – 11, 2019.

DAL VECHIO, F.; PRATES, I., GRAZZIOTIN, F. G.; ZAHER, H.; RODRIGUES, M. T. Phylogeography and historical demography of the arboreal pit viper *Bothrops bilineatus* (Serpentes, Crotalinae) reveal multiple connections between Amazonian and Atlantic rain forests. **Journal of Biogeography**, v. 45, p. 2415-2426, 2018.

DARWIN, C. **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.** London: Editora, 1859. 502 p.

FENWICK, A. M.; GREENE, H. W.; PARKINSON, C. L. The serpent and the egg: unidirectional evolution of reproductive mode in vipers? **J. Zoolog. Syst. Evol. Res.**, v. 50, n. 1, p. 59 – 66, 2012.

- FENWICK, A. M.; GUTBERLET Jr., R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617–640, 2009.
- FERRAREZZI, H.; FREIRE, E. M. X. New species of *Bothrops* Wagner, 1824 from the Atlantic Forest of Northeastern Brazil (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). **Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia**, v. 440, n. 19, p. 1 – 12, 2001.
- FIGUEIREDO, M. A. Unidades Fitoecológicas. In: IPLANCE (Ed.) **Atlas do Estado do Ceará**. Fortaleza: Fundação Instituto de Planejamento do Ceará (SEPLAN), Governo do Estado do Ceará, p. 28–29, 1997.
- GUEDES, T. B.; ENTIAUSPE-NETO, O. M.; COSTA, H. C. Lista de répteis do Brasil: atualizações de 2022. **Herpetologia Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 56-161, 2022.
- GUTBERLET Jr., R. L.; CAMPBELL, J. A. Generic recognition for a neglected lineage of South American pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the description of a new species from the Colombian Chocó. **American Museum Novitates**, v. 3316, p. 1–16, 2001.
- GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, C.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; MONTES-BORREGO, M.; PALOMARES-RIUS, J. E.; CASTILLO, P. Molecular phylogeny of the nematode genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) with description of three new species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 473 – 500, 2013.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMDAN, B.; GUEDES, T. B.; CARRASCO, P. A.; MELVILLE, J. A Complex biogeographic history of diversification in Neotropical lancehead pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 49, n. 2, p. 145 - 158, 2019.
- HARRIS, D. J.; ARNOLD, E. N.; THOMAS, R. H. Relationships of the lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial dna sequences and morphology. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 265, p. 1939–1948, 1998.
- HOGE, A. R.; BELLUOMINI, H. E. Uma nova espécie de *Bothrops* do Brasil (Serpentes). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 28, p. 195 – 206, 1957.
- ICMBIO. **Plano de Manejo: Parque Nacional de Ubajara**. 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/parnaubajara/planos-de-manejo>. Accesso em: 04. Julho. 2020.
- KADARUSMAN, N. H.; HADIATY, R. K.; SUDARTO, E. P.; POUYAUD, L. Cryptic diversity in Indo-Australian rainbowfishes revealed by DNA barcoding: implications for conservation in a biodiversity hotspot candidate. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e40627, p. 1 – 8, 2012.
- KOCHER T.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F. X. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animais: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6196 – 6200, 1989.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547 – 1549, 2018.

LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding in large scale. **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia**, v. 78, p. 177 – 198, 1984.

LINNAEUS, C. *Systema naturae per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. 10a ed. reformata. Holmiæ, Laurentii Salvii*, 824 p, 1758.

LIRA-DA-SILVA, R. M. *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae): natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, Supl. 1, p. 56 – 65, 2009.

LIU, J.; JIANG J.; SONG, S.; TORNABENE, L.; CHABARRIA, R.; NAYLOR, G. J. P.; LI, C. Multilocus DNA barcoding – Species Identification with Multilocus Data. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16601, p. 1 -12, 2017.

MALHORTA, A.; CREER, S.; POOK, C. E.; THORPE, R. S. Inclusion of nuclear intron sequence data helps to identify the Asian sister group of New World pitviper. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 172 – 178, 2010.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREEN, H. W. (Eds.) **Biology of the Vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, p. 307 – 328, 2002.

MAYR, E. The Biological Species Concept. In: WHEELER, Q.D; MEIER, R. (Ed.). Species concepts and phylogenetic theory: a debate. 2000.17-29p.

MAYR, E. The grow the of biological thought. **Belknap Harvard**, 1982. 974p.

MAYR, E.; DIAMOND, J. The birds of Northern Melanesia. Nova York: **Oxford University**, 2001. 548p.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; França, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. pp. 33-61.

MURPHY, R. W.; FU, J.; LATHROP, A.; FELTHAM, J. V.; KOVAC, V. Phylogeny of the rattlesnakes (*Crotalus* and *Sistrurus*) inferred from sequences of five mitochondrial DNA genes. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREEN, H. W. (Eds.). **Biology of Vipers**. Salt Lake City, Utah: Eagle Mountain Publishing, p. 69 – 92, 2002.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 4, p. 653–659, 2003.

OLIVEIRA, D. A. S.; DECRAEMER, W.; HOLOVACHOV, O.; BURR, J. A. Y.; TANDINGAN, I.; DE LEY, P.; MOENS, T.; DERYCKE, S. An integrative approach to characterize cryptic species in the *Thoracostoma trachygaster* Hope, 1967 complex (Nematoda: Leptosomatidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 164, p. 18 – 35, 2012.

- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, v. 7, p. 1 – 16, 2010.
- PARKINSON, C. L. Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia*, v. 1999, n. 3, p. 576-586, 1999.
- PARKINSON, C. L.; CAMPBELL, J. A.; CHIPPINDALE, P. Multigene phylogenetic analysis of pitvipers, with comments on the biogeography of the group. In: SCHUETT, G. W. (Ed.). **Biology of the vipers**. Salt Lake City, Utah: Eagle Mountain Publishing, p. 93 – 110, 2002.
- PINHEIRO, A. P.; SANTANA, W. A new and endangered species of *Kingsleyia* Ortmann, 1897 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae) from Ceará, northeastern Brazil. *Zootaxa*, v. 4171, n. 2, p. 365-372, 2016.
- PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate question in gboth methodologies. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 2, p. 339 – 346, 2010.
- PORTO, M.; TEIXEIRA, D. M. *Bothrops leucurus* (white-tailed lancehead). *Herpetological Review*, v. 26, n. 3, p. 156, 1995.
- PUORTO, G.; SALOMÃO, M. G.; THEAKSTON, R. D. G.; THORPE, R. S.; WARRELL, D. A.; WÜSTER, W. 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). *Journal of Evolutionary Biology*, v. 14, p. 527 – 538, 2001.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019.
- RIBEIRO, S. C.; ROBERTO, I. J.; SALES, D. L.; ÁVILA, R. W.; ALMEIDA, W. O. Amphibians and reptiles from the Araripe bioregion, northeastern Brazil. *Salamandra*, v. 48, n. 3, p. 133-146, 2012.
- ROBERTO, I. J.; LOEBMANN, D. Composition, distribution patterns, and conservation priority areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil. *Salamandra*, v. 52, n. 2, p. 134 – 152, 2016.
- SALDARRIAGA-CÓRDOBA, M.; PARKINSON, C. L.; DAZA, J. M.; WÜSTER, W.; SASA, M. Phylogeography of the Central American lancehead *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE). *PLoS ONE*, v. 12, n. 11, e0187969, p. 1 - 20, 2017.
- SANTOS, L. C.; TAVARES, M.; SILVA Jr., R. F.; CERVINI, M.; PINHEIRO, A. P.; SANTANA, W. A new species of freshwater crab genus *Fredius* Pretzmann, 1967 (Crustacea: Brachyura: Pseudothelphusidae) from a naturally isolated orographic forest enclave within the semiarid Caatinga in Ceará, northeastern Brazil. *PeerJ*, v. 8, n. e9370, p. 1-24, 2020.
- SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phylomedusa*, v. 7, n. 1, p. 45 – 90, 2008.

SINERIZ, M.; SCROCCHI, G. J.; ABATE, C. M. *Bothrops alternatus* 12S rRNA. Unpublished.

SOBRAL-SOUZA, T.; LIMA-RIBEIRO, M. S. De volta ao passado: revisitando a história biogeográfica das Florestas Neotropicais úmidas. **Oecologia Australis**, v. 21, n. 2, p. 93 – 107, 2017.

SOBRAL-SOUZA, T.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; SOLFERINI, V. N. Biogeography of Neotropical Rainforests: past connections between Amazon and Atlantic Forest detected by ecological niche modeling. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 5, p. 643–655, 2015.

SOUZA, M. J. N. Geomorfologia. In: IPLANCE (Ed). **Atlas do Ceará**. Fortaleza: Fundação Instituto de Planejamento do Ceará, Governo do Estado do Ceará, SEPLAN, p. 18–19, 1997.

TIMMS, J.; CHAPARRO, J. C.; VENEGAS, P. J.; SALAZAR-VALENZUELA, D.; SCROCCHI, G.; CUEVAS, J.; LEYNAUD, G.; CARRASCO, P. A. A new species of pitviper of the genus *Bothrops* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) from the Central Andes of South America. **Zootaxa**, v. 4656, n. 1, p. 99 – 120, 2019.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 5, p. 1193 – 1213, 2012.

UETZ, P.; FREED, P.; HOSEK, J. (Eds), 2020. **The Reptile Database**. Disponível em: www.reptile-database.org. Acesso em: Out.2020.

WITT, J. D.; THRELOFF, D. L.; HEBERT, P. D. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3073 – 3082, 2006.

WÜSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C. E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Mol. Phylogenetic Evol.**, v. 49, n. 2, p. 445 – 459, 2008.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; QUIJADA-MASCARENAS, J. A.; THORPE, R. S.; BBBSP. Origins and evolution of the South American pitvipers fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds) **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing, p. 111–129, 2002.

WÜSTER, W.; THORPE, R.; PUORTO, G.; BBBSP. 1996. Systematics of the *Bothrops atrox* complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brazil: a multivariate analysis. **Herpetologica**, v. 52, n. 2, p. 263 – 271, 1996.

ZAHER, H.; MURPHY, R. W.; ARREDONDO, J. C.; GRABOSKI, R.; MACHADO-FILHO, P. R.; MAHLOW, K.; MONTINGELLI, G. G.; QUADROS, A. B.; ORLOV, N. L.; WILKINSON, M.; ZHANG, Y. P.; GRAZZIOTIN, F. G. Large-scale molecular phylogeny, morphology, divergence-time estimation, and the fossil record of advanced caenophidian snakes (Squamata: Serpentes). **Plos One**, v. 14, n. 5, e0216148, p. 1- 82, 2019.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5a. Ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice-Hall, 944 p, 2010.

APÊNDICE A– MATERIAL ESTUDADO

***Bothrops aff. atrox* (N=28):** CEARÁ. **Ubajara:** CHUFC 2087, CHUFC 2089, CHUFC 2096, CHUFC 2378, CHUFC 2469, CHUFC 2568, CHUFC 2572, CHUFC 2901, CHUFC 2953, CHUFC 2956, CHUFC 3003, CHUFC 3013, CHUFC 3025, CHUFC 3040, CHUFC 3042, CHUFC 3358, CHUFC 3822, CHUFC 4005, CHUFC 4040, CHUFC 4300, CHUFC 4340, URCA-H 14573, URCA-H 14583, URCA-H 14584, URCA-H 14585, URCA-H 15753. **São Benedito:** CHUFC 2815.

***Bothrops atrox* (N=5):** AMAZONAS. **Manaus:** CHUFC 439, CHUFC 451. RONDÔNIA. **Porto Velho:** CHUFC 1424.

***Bothrops leucurus* (N=14):** ALAGOAS. **Quebrangulo:** URCA-H 3478, URCA-H 4105, URCA-H 4098, URCA-H 4224, URCA-H 4405, URCA-H 4822, URCAH 6554. BAHIA. **Maracani:** CHUFC 727. PERNAMBUCO. **Exu:** URCAH 3593, URCAH 6396, URCAH 6828, URCAH 11631. SÃO PAULO. **Fernandópolis:** CHUFC 655, CHUFC-2366.

***Bothrops moojeni* (N=11):** SÃO PAULO. **Jardinópolis:** CHUFC 510. **São Simão:** CHUFC 437. **Ribeirão Preto:** CHUFC 812. **Rubiácea:** CHUFC 811. GOIÁS. **Catalão:** CHUFC 1207. **Goiânia:** CHUFC 2021. MINAS GERAIS: CHUFC 1406, CHUFC 1551, CHUFC 4374. MATO GROSSO DO SUL. **Pantanal:** CHUFC 693, **Brasilândia:** URCAH 14779.