

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NEILDSON ALVES ARAÚJO

**QUEM SÃO AS *Lygophis* (SQUAMATA: DIPSADIDAE) DE ALAGOAS?
UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA PARA ELUCIDAR SUA
IDENTIDADE TAXONÔMICA**

Maceió
2024

NEILDSON ALVES ARAÚJO

**QUEM SÃO AS *Lygophis* (SQUAMATA: DIPSADIDAE) DE ALAGOAS? UMA
ABORDAGEM INTEGRATIVA PARA ELUCIDAR SUA
IDENTIDADE TAXONÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tamí Mott.

Maceió

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 –661

A663q Araújo, Neildson Alves.
Quem são as Lygophis (Squamata : Dipsadidae) de Alagoas? uma abordagem integrativa para elucidar sua identidade taxonômica / Neildson Alves Araújo. – 2024.
48 f : il.

Orientadora: Tamí Mott.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas : Bacharelado)
– Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió.
2024.

Bibliografia: f. 43-48.

1. Serpentes – Dados morfológicos. 2. Serpentes – Dados moleculares. 3. Squamata –
Ampliação e distribuição, Brasil. I. Título.

CDU: 598.16

Folha de Aprovação

NEILDSON ALVES ARAÚJO

QUEM SÃO AS *LYGOPHIS* (SQUAMATA: DIPSADIDAE) DE ALAGOAS? UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA PARA ELUCIDAR SUA IDENTIDADE TAXONÔMICA

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à banca examinadora do curso
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Alagoas e aprovada em 28 de
março de 2024.

Documento assinado digitalmente



TAMI MOTT

Data: 04/04/2024 09:26:34-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Tamí Mott
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente



JOAO ALBERTO FARINELLI PANTALEAO

Data: 04/04/2024 09:23:40-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Interno – Dr. João Alberto Farinelli Pantaleão
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente



LEONORA TAVARES BASTOS

Data: 04/04/2024 09:42:20-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora Interna – Dra. Leonora Tavares Bastos
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*À minha mãe, Nirlanez, por todo o sacrifício
feito para que eu pudesse enxergar mais longe.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente Gostaria de agradecer a Deus, por nunca ter me abandonado, por ter me dado forças para continuar mesmo em momentos tão difíceis e por ter sido a minha inspiração em cada ação e decisão que tomei.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esta jornada acadêmica:

Primeiramente, dedico este trabalho à memória amorosa e inspiradora de minha mãe, Nirlanez. Mesmo não estando mais comigo fisicamente, seus ensinamentos continuam a iluminar meu caminho, e sua memória será eternamente honrada por seu apoio incondicional e amor infinito.

Aos demais familiares, representados por minha avó Ridan, Meus irmão Fernanda, Flaviany, Nildson, Neldson, meus sobrinhos e em especial à minha irmã Nirlinha, por seu apoio incondicional, por ser um exemplo de força e determinação e por ter sido, além de dupla na vida, a minha dupla na academia desde o ensino médio até os dias de hoje. expresso minha sincera gratidão e tenho certeza que nós ainda vamos estar juntos em muitos outros desafios.

À minha orientadora, Dra. Tamí Mott, quero expressar minha profunda gratidão por sua orientação paciente e confiança em meu trabalho. Seus ensinamentos e conselhos foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo e certamente eu me formo uma pessoa completamente diferente da que eu era quando cheguei ao seu laboratório.

Quero agradecer também a Bruna, Karen, Anny, Matheus, Aline e a todos os meus colegas de laboratório por toda a ajuda que me foi dada desde o dia que cheguei e por todas as nossas conversas bestas e profundas na salinha do LABI ou tarde da noite em campo sentados no chão.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à Isa, que mesmo com todas as suas demandas, que no início eram da graduação e que hoje são do mestrado, nunca mediu esforços para me salvar quando eu estava desesperado e sempre esteve disposta a me estender a mão, não importando o tamanho do desafio. Sem você eu provavelmente não teria feito metade desse trabalho.

Aos meus amigos da graduação, em especial Nanda, Marta, Thuelly, Mércia, Alícia e todos os outros, minha profunda gratidão por tornarem todos esses anos mais leves. Sem vocês do meu lado eu não sei se conseguiria chegar até aqui.

À toda equipe técnica e professores do ICBS/UFAL, expresso minha gratidão por compartilharem conhecimento, experiências e amizade ao longo desta jornada. Em especial, gostaria de agradecer à Jéssika pela paciência para me ajudar com a abordagem molecular, sua ajuda foi fundamental.

À Universidade Federal de Alagoas, por ter me proporcionado uma educação gratuita e de qualidade, e também pelas bolsas de PIBIC que me foram concedidas ao decorrer da graduação.

Gostaria de agradecer também à MANEFAU Consultoria e Serviços Ambientais Ltda, por nos ceder alguns exemplares oriundos de resgates de fauna. Esses exemplares foram

fundamentais para a realização do presente estudo.

Por último, mas não menos importante, agradeço a mim mesmo, por minha perseverança, determinação e por nunca desistir, mesmo diante dos desafios. Este momento é resultado de anos de trabalho árduo e dedicação.

A todos vocês, meu mais profundo obrigado por fazerem parte desta história e por tornarem este momento possível

RESUMO

O gênero de serpentes *Lygophis* inclui oito espécies terrestres e diurnas, sendo amplamente distribuído nos neotrópicos (do Panamá à Argentina). Seis espécies de *Lygophis* possuem registro confirmado para o território brasileiro, sendo nenhum registro para o estado de Alagoas. Ademais, um estudo recente não previu Alagoas como área com adequabilidade ambiental para a ocorrência de *Lygophis*. Pesquisadores do Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas (MHN-UFAL) coletaram indivíduos de *Lygophis* em Craíbas e Santana do Ipanema, Alagoas. Desse modo, este estudo visou determinar a identificação taxonômica desses indivíduos por meio de uma abordagem integrativa, combinando dados morfológicos e moleculares. Dez espécimes incorporados à Coleção Herpetológica do MHN-UFAL e previamente identificados como *Lygophis* sp. foram analisados. Dez caracteres merísticos e quatro morfométricos foram aferidos. O número de escamas dorsais (17 no terço anterior, 17 no meio e 15 no terço posterior), oito supralabiais, 165 a 172 ventrais, 62 a 74 subcaudais, uma préocular, duas póstemporais, nove infralabiais e a presença de placa anal inteira foram as contagens obtidas e se encaixam na diagnose de *Lygophis paucidens* proposta por Dixon (1989) e Lema (1989). O Comprimento rostro-cloacal de 250 a 380mm, o comprimento do corpo de 66 a 135mm, o comprimento da cabeça de 9,8 a 20,63mm e a largura da cabeça 4,74 a 10,78mm são medidas também encontradas em *L. paucidens*. Foi realizada uma Análise de Variância Univariada (ANOVA) para verificar a existência de dimorfismo sexual. As *Lygophis* coletadas em Alagoas não apresentaram dimorfismo sexual, pois os valores de F e de p não foram significativos em relação aos caracteres morfométricos analisados. Na abordagem molecular, sete amostras de tecido previamente incorporadas ao Banco de Tecidos do MHN-UFAL foram utilizadas para amplificação do gene mitocondrial estrutural 16S rRNA (318 pares de base) e do gene nuclear c-mos (360 pares de base). As sequências resultantes foram alinhadas com sequências de congêneres e de gêneros irmãos, e as árvores filogenéticas foram enraizadas com *Psomophis genimaculatus* (16S rRNA) e *Magliophis exiguum* (c-mos). As análises de inferência bayesiana utilizando o modelo evolutivo TRN+G e HKY para 16S rRNA e c-mos respectivamente confirmaram que as *Lygophis* de Alagoas formam um grupo monofilético. Ademais, as *Lygophis* de Alagoas se agruparam com a *Lygophis paucidens* disponível no GenBank, não apresentando divergência genética entre elas no gene c-mos e uma divergência genética de 6,8% com *L. dilepis* no fragmento do gene 16S rRNA. Desse modo, integrando dados morfológicos e moleculares, este estudo confirma o primeiro registro de *Lygophis paucidens* para o estado de Alagoas. Este registro amplia a distribuição geográfica da espécie em 620 km ao Nordeste de sua ocorrência mais próxima, no município de Gentio do Ouro, no estado da Bahia, e contribui para reduzir o déficit wallaceano.

Palavras-chave: serpente, dados morfológicos, dados moleculares, ampliação de distribuição, Brasil.

ABSTRACT

The snake genus *Lygophis* includes eight terrestrial and diurnal species, being widely distributed in the Neotropics (from Panama to Argentina). Six species of *Lygophis* have confirmed records for Brazilian territory, with no records for the state of Alagoas. Furthermore, a recent study did not predict Alagoas as an area with environmental suitability for the occurrence of *Lygophis*. Researchers from the Natural History Museum of the Federal University of Alagoas (MHN-UFAL) collected individuals of *Lygophis* in Craíbas and Santana do Ipanema, Alagoas. Therefore, this study aimed to determine the taxonomic identification of these individuals through an integrative approach, combining morphological and molecular data. Ten specimens incorporated into the MHN-UFAL Herpetological Collection and previously identified as *Lygophis* sp. were analyzed. Ten meristic and four morphometric characters were measured. The number of dorsal scales (17 in the anterior third, 17 in the middle and 15 in the posterior third), eight supralabials, 165 to 172 ventrals, 62 to 74 subcaudals, one preocular, two posttemporals, nine infralabials and the presence of an entire anal plate were the counts obtained and match the diagnosis of *Lygophis paucidens* proposed by Dixon (1989) and Lema (1989). The snout-vent length of 250 to 380mm, the body length of 66 to 135mm, the head length of 9.8 to 20.63mm and the head width of 4.74 to 10.78mm are measurements also found in *L. paucidens*. A Univariate Analysis of Variance (ANOVA) was performed to verify the existence of sexual dimorphism. The *Lygophis* collected in Alagoas did not show sexual dimorphism, as the F and p values were not significant in relation to the morphometric characters analyzed. In the molecular approach, seven tissue samples previously incorporated into the MHN-UFAL Tissue Bank were used for amplification of the mitochondrial structural gene 16S rRNA (318 base pairs) and the nuclear c-mos gene (360 base pairs). These sequences were aligned with sequences from congeners and sister genera, and the phylogenetic trees were rooted with *Psomophis genimaculatus* (16S rRNA) and *Magliophis exiguum* (c-mos). Bayesian inference analyzes using the TRN+G and HKY evolutionary model for 16S rRNA and c-mos respectively confirmed that *Lygophis* from Alagoas form a monophyletic group. Furthermore, *Lygophis* from Alagoas grouped with *Lygophis paucidens* available in GenBank, showing no genetic divergence between them in the c-mos gene and a genetic divergence of 6.8% with *L. dilepis* in the 16S rRNA gene fragment. Thus, by integrating morphological and molecular data, this study confirms the first record of *Lygophis paucidens* for the state of Alagoas. This record expands the geographical distribution of the species by 620 km to the Northeast of its closest occurrence, in the municipality of Gentio do Ouro, in the state of Bahia, and contributes to reducing the Wallacean deficit.

Keywords: snake, morphological data, molecular data, distribution expansion, Brazil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de um fragmento do território brasileiro destacando as os estados cujo a espécie *Lygophis paucidens* apresenta registro confirmado. Circulos amarelos destacam os estados com ocorrência registrada de *Lygophis paucidens* até o presente estudo. Em destaque estão os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Tocantins e Distrito Federal. Mapa elaborado por Bruna Barbosa. *Inset* Mapa da América do Sul destacando os estados do Brasil. 17
- Figura 2. Mapa da região Nordeste do Brasil destacando as localidades cujos espécimes de *Lygophis* foram coletados. Os dois losangos em vermelho representam os municípios alagoanos em que os espécimes foram coletados (Craíbas e Santana do Ipanema). Círculos azuis representam os municípios do Ceará (Milagres e Ubajara) e Rio Grande do Norte (Açú e Lajes) onde os espécimes de *Lygophis* foram coletados. Mapa elaborado por Bruna Barbosa. *Inset* Mapa da América do Sul destacando os estados do Brasil..... 30
- Figura 3. Esquema ilustrando alguns dos principais conjuntos de escamas (caracteres merísticos) que são analisados em estudos taxonômicos de serpentes. O número de escamas supralabiais, de escamas ventrais, de subcaudais e três fileiras de escamas dorsais foram contabilizadas neste estudo sobre as *Lygophis* de Alagoas. 31
- Figura 4. Relações filogenéticas de *Lygophis* spp. estimadas através de uma inferência Bayesiana utilizando um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA. Valores de probabilidades posteriores acima de 0,95 foram considerados altos e são apresentados na filogenia. Os espécimes em negrito foram sequenciados neste estudo..... 38
- Figura 5. Relações filogenéticas de *Lygophis* spp. estimadas através de uma inferência Bayesiana utilizando um fragmento de 380 pares de base do gene nuclear c-mos. Valores de probabilidades posteriores acima de 0,95 foram considerados altos e são apresentados na filogenia. Os espécimes em negrito foram sequenciados neste estudo 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Caracteres merísticos aferidos nas *Lygophis* coletados no estado de Alagoas, Brasil. Na tabela apenas os caracteres que apresentam variação estão expressos. Número de escamas ventrais (EV), número de escamas subcaudais (ESC). Exemplos MHNUFAL 16145, 16146, 17758, 17759, 17760 e 17764 são machos e os exemplares MHNUFAL 17761, 17765, 17766 e 17767 são fêmeas. Indivíduo de Santana do Ipanema está destacado com um asterisco, todos os outros são provenientes do município de Craíbas. Hífen representa ausência de dado devido a impossibilidade de aferir o caráter..... 33
- Tabela 2. Caracteres morfométricos de *Lygophis* coletados no estado de Alagoas, Brasil. Valores em milímetros (mm). Comprimento do Corpo (CC), Comprimento da Cabeça (CCa), Largura da Cabeça (LCa) e Comprimento Rostro-Cloacal. Asterisco é o exemplar coletado do município de Santana do Ipanema, os outros exemplares foram coletados em Craíbas. Hífen representa ausência de dado devido a impossibilidade de aferir o caráter34
- Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) utilizando quatro caracteres morfométricos para os indivíduos fêmeas e machos de *Lygophis* do estado de Alagoas, Brasil. (N total=10; N fêmeas=4; N machos=6).34
- Tabela 4. Concentração e pureza das extrações de DNA genômico total obtido de tecidos hepáticos de sete exemplares de *Lygophis* coletadas no estado de Alagoas, Brasil35
- Tabela 5. Distância genética p intraespecífica para as espécies do gênero *Lygophis* utilizadas na filogenia apresentada neste estudo. Distância calculada a partir de um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA..... 35
- Tabela 6. Distância genética p interespecífica para algumas das espécies do gênero *Lygophis* utilizadas em uma das filogenias apresentada neste estudo. Distância calculada a partir de um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA. Os nomes em negrito representam as sequências geradas neste estudo 36

Tabela 7. Distância genética p interespecífica para algumas das espécies do gênero *Lygophis* utilizadas em uma das filogenias apresentada neste estudo. Distância calculada a partir de um fragmento de 360 pares de base do gene nuclear c-mos. Os nomes em negrito representam as sequências geradas neste estudo36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL - Alagoas

ANOVA - Análise de Variância

CC - Comprimento da cauda

CCa - Comprimento da cabeça

CE - Ceará

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CRC - Comprimento rostro-cloacal

EDA - Número de escamas dorsais no terço anterior do corpo

EDM - Número de escamas dorsais no meio do corpo

EDP - Número de escamas dorsais no terço posterior do corpo

EIL - Número de escamas infralabiais

ESC - Número de escamas subcaudais

ESL - Número de escamas supralabiais

EV - Número de escamas ventrais

ICBS - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

LABI - Laboratório de Biologia Integrativa

LCa - Largura da cabeça

MHN- Museu de História Natural

NPrO - Número de escamas pré-oculares

NPT - Número de escamas póstemporais

PA - Placa anal

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PP - Probabilidade posterior

RN - Rio Grande do Norte

SISBio - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UFAL - Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Serpentes	18
2.2 Taxonomia	19
2.2.1 Taxonomia morfológica.....	20
2.2.2 Taxonomia molecular.....	21
2.2.3 Taxonomia integrativa.....	22
2.3 Modelagem de distribuição de espécies	23
2.4 Lacunas do conhecimento	24
2.5 <i>Lygophis</i> FITZINGER, 1843	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material analisado	29
3.1.1 Abordagem morfológica	30
3.1.2 Abordagem molecular.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Abordagem morfológica	33
4.2 Abordagem molecular	34
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Lygophis FITZINGER, 1843 é um gênero de serpentes terrestres e diurnas, não peçonhentas, amplamente distribuídas nos neotrópicos, ocorrendo do Panamá até a Argentina (CERON *et al.*, 2021; DIXON, 1989; UETZ *et al.*, 2023). O gênero aloca oito espécies *L. anomalus* (GUNTHER, 1858); *L. dilepis* COPE, 1862; *L. flavifrenatus* COPE, 1862; *L. lineatus* (LINNAEUS, 1758); *L. meridionalis* (SCHENKEL, 1901); *L. paucidens* HOGE, 1953; *L. elegantissimus* (KOSLOWSKY, 1896), e *L. vanzolinii* (DIXON, 1985). Este gênero pertence a tribo monofilética Xenodontini BONAPARTE, 1845, na qual agrupa outros dois gêneros: *Xenodon* e *Erythrolamprus* (GRAZZIOTIN *et al.*, 2012; SERRANO *et al.*, 2020). Xenodontini é uma tribo pertencente à família Dipsadidae, a mais rica da região neotropical, com aproximadamente 840 espécies (GRAZZIOTIN *et al.*, 2012; UETZ *et al.*, 2023). Grazziotin *et al.* (2012) realizaram um estudo filogenético incluindo 246 espécies de serpentes (188 dipsadídeos, sendo cinco espécies de *Lygophis*) e incorporaram informação de cinco genes mitocondriais (12S, 16S rRNA, cytb, nd2, nd4) e três nucleares (bdnf, c-mos, rag2); *Lygophis* foi recuperado monofilético. Dentre as oito espécies atuais de *Lygophis*, seis apresentam registros confirmados para o território brasileiro: *L. anomalus*, *L. dilepis*, *L. flavifrenatus*, *L. lineatus*, *L. meridionalis* e *L. paucidens* (GUEDES *et al.*, 2023).

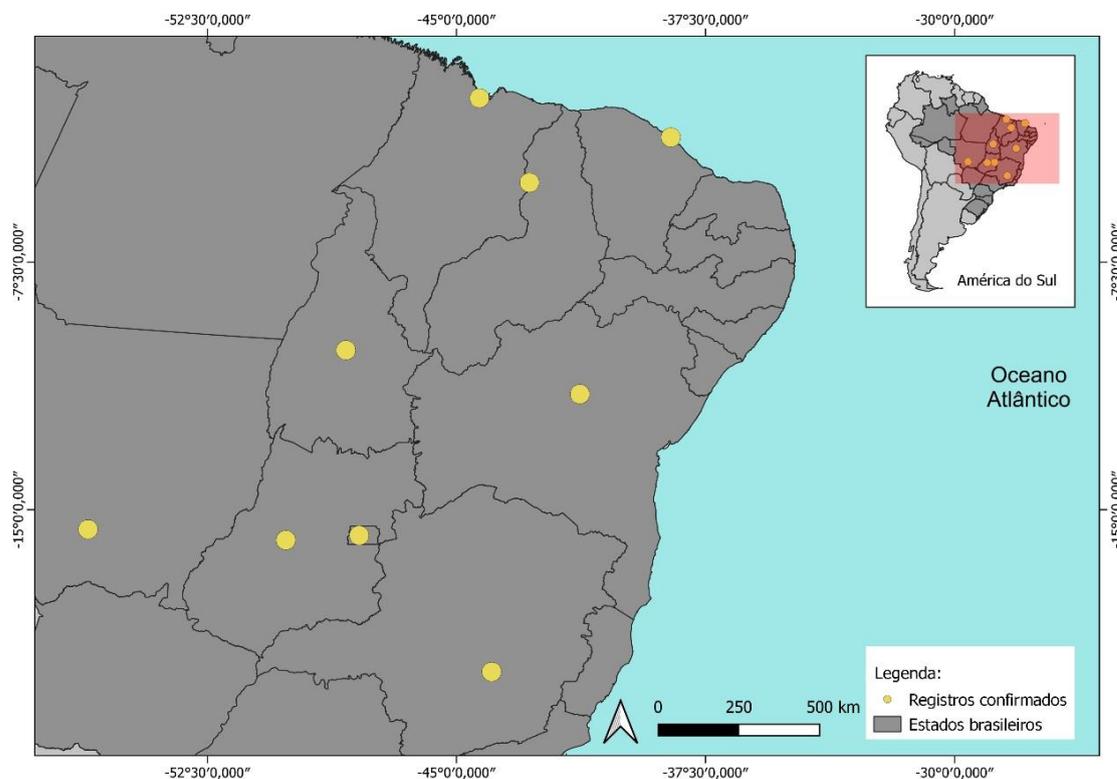
Recentemente, pesquisadores vinculados ao Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas coletaram indivíduos de *Lygophis* nos municípios de Craíbas e Santana do Ipanema, estado de Alagoas, Brasil. De acordo com estudos recentes (CERON *et al.*, 2021; GUEDES *et al.*, 2023; NOGUEIRA *et al.*, 2019) este achado é inesperado pois de acordo com a lista brasileira de répteis, não há registro do gênero *Lygophis* em Alagoas (GUEDES *et al.*, 2023) e nem adequabilidade ambiental para a ocorrência deste gênero no Estado (CERON *et al.*, 2021).

Uma análise preliminar de morfologia externa constatou uma maior semelhança morfológica com *L. paucidens*. *Lygophis paucidens* foi descrita por Hoge em 1953 a partir de um espécime coletado na Aldeia de Mato Verde, próxima à Ilha do Bananal, atualmente município de Luciara, estado de Mato

Grosso, Brasil (SERRANO *et al.*, 2020). Em 2013 o conhecimento sobre a distribuição geográfica de *L. paucidens* foi ampliada consideravelmente, incluindo o registro para uma área de cerrado na Reserva Natural Laguna Blanca, Paraguai, sendo a única localidade fora do Brasil (SERRANO *et al.*, 2020). O registro para o Paraguai ampliou a distribuição da espécie em mais de 700 km a sudoeste do registro mais próximo, no Mato Grosso (CACCIALI *et al.*, 2013; SERRANO *et al.*, 2020). Até o trabalho de Serrano *et al.* (2020), o mapa de distribuição de *L. paucidens* disponível havia sido sugerido por Dixon em 1989 (SERRANO *et al.*, 2020). Estudos recentes ampliaram consideravelmente a distribuição geográfica da espécie.

No Brasil, esta espécie é encontrada em ambientes abertos (Caatinga, Cerrado e Chaco), apresentando registro para os estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí e Tocantins (CERON *et al.*, 2021; GUEDES *et al.*, 2023; NOGUEIRA *et al.*, 2019) (**Figura 1**). *Lygophis paucidens* parece ocorrer principalmente em locais com solo arenoso (CACCIALI *et al.*, 2013; SERRANO *et al.*, 2020), sugerindo uma distribuição descontínua no Brasil, ou uma distribuição rarefeita fora dos ambientes de solo arenoso. Poucos representantes da espécie estão disponíveis nos acervos zoológicos e pouco se sabe sobre a sua história natural (SERRANO *et al.*, 2020) sendo considerada uma espécie rara. A forte associação psamófila pode explicar sua raridade e distribuição disjunta (SERRANO *et al.*, 2020) ou ainda pode refletir o déficit Wallaceano refletindo nossa ignorância sobre sua distribuição geográfica (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Figura 1. Mapa de um fragmento do território brasileiro destacando as os estados cujo a espécie *Lygophis paucidens* apresenta registro confirmado. Circulos amarelos destacam os estados com ocorrência registrada de *Lygophis paucidens* até o presente estudo. Em destaque estão os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Tocantins e Distrito Federal. Mapa elaborado por Bruna Barbosa. *Inset* Mapa da América do Sul destacando os estados do Brasil.



Uma característica morfológica marcante de *L. paucidens* é a presença de três linhas longitudinais escuras, na parte posterior do corpo, que desaparecem repentinamente próximo à cabeça (SERRANO *et al.*, 2020). *Lygophis paucidens* apresenta 17-17-15 fileiras de escamas dorsais, distinguindo-se de *L. dilepis*, com localidade tipo em Presidente Hayes, Paraguai, que apresenta 19-19-15 fileiras. Além disso, a foliose diagnóstica de *L. paucidens* consiste em oito escamas supralabiais, 165-174 escamas ventrais e 62-72 escamas subcaudais (CACCIALI *et al.*, 2013; DIXON, 1989; LEMA, 1989). O número de dentes maxilares (menos de 13) e o seu padrão de listras escuras que partem da parte posterior da cabeça pode diferenciar *L. paucidens* de outras espécies de *Lygophis*, como a *L. flavifrenatus*, que possui mais que 13 dentes maxilares e dorso com três listras escuras e duas amarelas, que começam no focinho, ou ainda a *L. anomalus* que pode apresentar de 13 a 17 dentes superiores, ou a *L. vanzolinii* que possui de 18 a 20 dentes superiores (DIXON, 1989).

Um estudo realizado com quatro espécies de *Lygophis* (*L. paucidens*, *L. dilepis*, *L. flavifrenatus* e *L. meridionalis*) utilizando modelagem de distribuição potencial de espécie não previu o estado de Alagoas como área de adequabilidade ambiental para a ocorrência de nenhuma das espécies inclusas no estudo (CERON *et al.*, 2021), aumentando ainda mais a incerteza da identidade taxonômica desses indivíduos coletados em Alagoas. Neste estudo, 435 registros de ocorrência para as quatro espécies de *Lygophis* (94 para *L. dilepis*, 222 para *L. flavifrenatus*, 69 para *L. meridionalis* e 50 para *L. paucidens*) foram utilizados e correlacionados com variáveis bioclimáticas, edáficas e topográficas utilizando vários algoritmos para prever áreas de adequabilidade ambiental (CERON *et al.*, 2021). O estado de Alagoas não apresentou adequabilidade ambiental para nenhuma das quatro espécies analisadas.

Desse modo, nosso estudo busca determinar, através de uma abordagem integrativa, quem são as *Lygophis* coletadas nos municípios de Craíbas e Santana do Ipanema, no estado de Alagoas, Brasil. Dados da morfologia externa (folidose) e dados moleculares (gene mitocondrial 16S rRNA e gene nuclear c-mos) destes indivíduos serão analisados e integrados visando determinar a sua identificação taxonômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Serpentes

Os répteis atuais incluem aproximadamente 12.060 espécies mundiais, dentre as quais, aproximadamente 361 são Testudines, 27 Crocodylia, um Sphenodontia, e 11.671 são Squamata (UETZ *et al.*, 2023). A ordem Squamata representa uma das mais diversas e bem-sucedidas linhagens de répteis existentes e inclui os lagartos (7.396 espécies), serpentes (4.073 espécies) e anfisbênias (202 espécies). Esta ordem é caracterizada por escamas epidérmicas e órgão copulador diferenciado em uma estrutura par, denominado hemipênis (BENEDITO, 2017; PYRON, BURBRINK & WIENS, 2013). Atualmente o Brasil é o terceiro país com maior riqueza de répteis no mundo, 856 espécies de répteis atuais já foram registradas, sendo 435 serpentes, 295 lagartos, 39 Testudines, seis Crocodylia e 81 anfisbênias (GUEDES *et al.*, 2023).

Na história evolutiva dos Squamata, dois grandes clados se diferenciaram com base na morfologia e na ecologia: Iguania (Iguanidae, Agamidae, Chamaeleonidae) e Scleroglossa (todas as outras famílias de lagartos, inclusive anfisbênias, e serpentes) (POUGH, JANIS & HEISER, 2008; ROCHA-BARBOSA *et al.*, 2017). As serpentes são divididas em dois grandes grupos, Scolecophidia (conhecidas como cobras-cega) e Alethinophidia (ou serpentes verdadeiras). Dentre as quatro famílias de serpentes Alethinophidia (Colubridae, Elapidae, Viperidae e Boidae), Colubridae é a mais numerosa, com aproximadamente 75% das espécies registradas (ROCHA-BARBOSA *et al.*, 2017; UETZ *et al.*, 2023).

Historicamente, os representantes ápodes têm sido particularmente difíceis de serem classificados com base na morfologia porque a condição “sem membros” elimina vários caracteres da análise por serem homoplásticos (TOWNSEND *et al.*, 2004). Estudos filogenéticos recentes, como os conduzidos por Reeder *et al.* (2015) têm redefinido as relações evolutivas dentro de Squamata, contribuindo para uma compreensão mais refinada sobre a diversidade e história evolutiva desses répteis. Serpentes, anfisbênias e lagartos Dibamidae que são linhagens ápodas, cujas posições filogenéticas historicamente têm sido impossíveis de serem determinadas com confiança, não foram recuperadas coesas sugerindo que a condição ápoda evoluiu de forma independente (GRAZZIOTIN *et al.*, 2012; PYRON, 2016). Apesar das serpentes e alguns lagartos serem ápodas e utilizarem de peçonha para a captura de presas, essas evoluções ocorreram de forma independente, pois as dinâmicas evolutivas nas serpentes são qualitativamente diferentes daquelas dos lagartos (TITLE *et al.*, 2024).

2.2 Taxonomia

A taxonomia, frequentemente descrita como a "ciência da diversidade biológica", desempenha um papel fundamental em diversos campos científicos (BICUDO, 2004). A taxonomia é a ciência que visa a identificação de espécies sendo a base para estudos ecológicos, biogeográficos, evolutivos entre outros (COLEMAN, 2015; ENGEL *et al.*, 2021). A organização sistemática dos organismos é essencial para compreender a complexidade da vida na Terra (MAYR, 1982), entretanto desde o final dos anos 1980, é visto um grande

declínio de taxonomistas nas universidades, sendo relatado como a crise taxonômica (WHEELER, 2014). Além da falta global na formação de taxonomistas, o pouco prestígio ofertado pela comunidade científica em relação a taxonomia ainda é um dos grandes problemas, assim como a dificuldade para coletar, estudar e armazenar os exemplares de campo (ENGEL *et al.*, 2021). A maior parte dos taxonomistas no Brasil se formaram na década de 1980, mantendo a média de idade dos taxonomistas entre 45-50 anos. E o número de surgimentos de novos especialistas diminuiu consideravelmente por volta da década de 1990 (ANDENA, 2014).

Wheeler e Meier (2000) reforçam que a taxonomia contribui significativamente para a conservação da biodiversidade, permitindo a identificação de espécies ameaçadas e contribuindo para a formulação de estratégias de conservação. Em síntese, a taxonomia não é apenas uma disciplina científica, mas nomear espécies é uma necessidade indispensável pois permeia diversas áreas, contribuindo para a compreensão, conservação e aplicação prática da diversidade biológica no planeta (DAYRAT, 2005).

2.2.1 Taxonomia morfológica

Inicialmente, a classificação de serpentes era predominantemente baseada em características morfológicas (PYRON, BURBRINK & WIENS, 2013). O número e arranjo das escamas (foliose), a morfologia craniana, características dentárias e a presença de órgãos específicos, como os órgãos de Jacobson e hemipênis vem sendo utilizados na taxonomia de serpentes (GREENE, 1997). Estudos detalhados dessas características forneceram uma base robusta para distinguir entre diferentes grupos taxonômicos, revelando padrões de adaptação e evolução ao longo do tempo (PYRON *et al.*, 2014).

A morfologia oferece uma base para a identificação e classificação de espécies, proporcionando percepções valiosas sobre as relações filogenéticas (GAUTHIER *et al.*, 2012). Essa abordagem morfológica utilizando principalmente características externas e de anatomia desempenhou um papel fundamental na compreensão da diversidade e evolução das serpentes, mas apresentava limitações (GAUTHIER *et al.*, 2012; DAYRAT, 2005).

2.2.1.1 Morfologia externa

A folidose, uma técnica intrínseca à taxonomia morfológica de répteis, é um método que se destaca pela minuciosa contagem e análise das escamas que compõem o revestimento epidérmico desses animais (SUEIRO, 2010). Gouveia (2013) destaca a importância da folidose, enfatizando que a contagem detalhada das escamas ao longo do corpo fornece informações cruciais para os herpetólogos, possibilitando uma identificação e classificação precisa das espécies.

2.2.2 Taxonomia molecular

A taxonomia molecular apresenta promissora na identificação de espécies não registradas ou espécies com identificação equivocada (STADEN *et al.*, 2023) e tem emergido como uma ferramenta fundamental na classificação precisa e na compreensão das relações evolutivas entre organismos (HEBERT; RATNASINGHAM & DEWAARD, 2003). A análise de informação do DNA oferece uma abordagem poderosa para a identificação e classificação de espécies, superando as limitações da taxonomia morfológica tradicional (HEBERT; RATNASINGHAM & DEWAARD, 2003). Essa abordagem tem permitido uma revisão mais detalhada das classificações existentes e revelado novas perspectivas sobre a diversidade biológica. A taxonomia molecular não apenas facilita a identificação de espécies em diferentes estágios de desenvolvimento ou em condições ambientais variáveis, como também tem sido importante na descoberta de novas espécies (HAJIBABAEI *et al.*, 2007). No entanto, surge um debate importante sobre a prática exclusiva de utilizar dados moleculares na descrição taxonômica de espécies. Apenas análises genéticas podem ser insuficientes para uma identificação sólida e segura, causando incerteza sobre a confiabilidade dos resultados obtidos (EDWARDS & KNOWLES, 2014).

A taxonomia molecular oferece uma resolução sem precedentes para a identificação de espécies, especialmente em grupos onde a variação morfológica é reduzida, pois pode detectar diferenças genéticas sutis entre as espécies (HILLIS & WILCOX, 2005). A utilização de dados moleculares em conjunto com outras abordagens, contribui para a delimitação de espécies, mas também esclarece relações filogenéticas entre diferentes táxons, proporcionando

percepções importantes sobre padrões evolutivos e histórias biogeográficas (BRANDLEY; HUELSENBECK & WIENS, 2007). A implementação da taxonomia molecular em estudos de serpentes não apenas refinou a classificação de muitas espécies, mas também revelou a existência de unidades taxonômicas previamente não reconhecidas, evidenciando a importância dessa abordagem no contexto da conservação e pesquisa biológica das serpentes (ASZTALOS *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2024; DUQUE *et al.*, 2023; GRAZZIOTIN *et al.*, 2012; PYRON; BURBRINK & WIENS, 2013; PYRON & WALLACH, 2011).

2.2.3 Taxonomia integrativa

A integração de dados provenientes de diferentes fontes permite uma classificação mais robusta e refinada, especialmente em casos onde a variabilidade morfológica é limitada ou a divergência genética não é refletida em características externas (DAYRAT, 2005; PADIAL *et al.*, 2010). A taxonomia integrativa proposta por Dayrat (2005) representa uma abordagem científica inovadora que busca integrar diversas fontes de evidências para caracterizar e delimitar espécies. As estratégias utilizadas na taxonomia integrativa são duas: princípio da congruência na qual é esperado uma congruência entre múltiplas fontes de evidências e o princípio por acumulação, onde divergências em uma ou mais fontes de evidências são permitidas e o que prevalece é o que a maioria das fontes revela (PADIAL *et al.*, 2010).

A taxonomia integrativa fundamenta na premissa de que a utilização de dados morfológicos, moleculares e ecológicos de forma combinada pode aprimorar significativamente a resolução taxonômica (EDWARDS & KNOWLES, 2014). Como observado por Padial *et al.* (2010), a integração de dados morfológicos e moleculares permite uma análise mais precisa da variabilidade intraespecífica e intercontinental. Dayrat (2005) destaca que, ao incorporar dados comportamentais e ecológicos, a taxonomia integrativa oferece uma visão mais completa das relações evolutivas e da adaptação ao ambiente.

A taxonomia integrativa não apenas aprimora a precisão na identificação taxonômica, mas também contribui para a descoberta de unidades taxonômicas previamente não reconhecidas, promovendo uma visão mais abrangente da biodiversidade (DAYRAT, 2005; SCHLICK-STEIER *et al.*, 2010). E apesar de alguns pesquisadores defenderem uma abordagem minimalista argumentando

que esse tipo de abordagem acelera a identificação de novas espécies, Zamani et al. (2022) reforçaram que não há evidências de efeito retardador na integração de vários tipos de dados.

Em suma, a taxonomia integrativa emerge como uma ferramenta essencial para lidar com os desafios taxonômicos, evitando que um tipo de dado altere a identificação das espécies e promovendo uma classificação mais precisa e contextualizada da biodiversidade (DAYRAT, 2005; ZAMANI *et al.*, 2022). O trabalho de Chaney et al. (2021) incluiu quatro espécies de serpentes do gênero *Grayia*, que são serpentes aquáticas africanas da família Colubridae, e utilizaram um gene nuclear (*bdnf*) e quatro genes mitocondriais (16S rRNA, *cyt b*, COI, ND4) para reconstruir hipóteses filogenéticas em conjunto com dados morfológicos pré-existentes. O estudo de Mello et al. (2023) revisitou a taxonomia de lagartos da família Gymnophthalmidae, através da congruência entre o gene mitocondrial (*Cytb*), os genes nucleares (*c-mos* e *prlr*) e dados morfológicos (merísticos, morfométricos e hemipeniano). Esses são alguns dos vários exemplos do quanto a taxonomia integrativa vem sendo utilizada em estudos com Squamata.

2.3 Modelagem de distribuição de espécies

Desde o início do século XIX, pesquisadores como Humboldt e Bonpland, em 1807, e Wallace, em 1855, reconheciam a importância do clima na explicação da distribuição de animais e plantas (GUISAN & ZIMMERMANN, 2000). Estes pesquisadores foram alguns dos biogeógrafos pioneiros, e já compreendiam o potencial dos modelos para representar as complexas interações entre os organismos e o ambiente (GUISAN, THUILLER & ZIMMERMANN, 2000). A modelagem de distribuição de espécies começou a ganhar destaque nas décadas de 1960 e 1970, quando a disponibilidade de computadores permitiu a aplicação de métodos estatísticos avançados (PEARSON & DAWSON, 2003).

A compreensão da distribuição geográfica das espécies e dos fatores que afetam sua presença é crucial para a conservação da biodiversidade (CERON *et al.*, 2021). A Modelagem de Distribuição de Espécies surge como uma ferramenta importante, fornecendo uma base sólida para análises direcionadas à preservação de espécies ameaçadas de extinção (ALEXANDRE; LORINI & GRELE, 2013). Os modelos de envelope bioclimático frequentemente estão

sujeitos a debate, mas quando aplicados com uma reflexão cuidadosa e uma compreensão precisa de suas limitações e pressupostos, têm o potencial de oferecer valiosas percepções sobre a distribuição potencial das espécies (ARAÚJO & PETERSON, 2012).

A abordagem utiliza técnicas estatísticas avançadas para prever a distribuição geográfica potencial de uma espécie com base em variáveis ambientais e os pontos de ocorrência da espécie em questão. Os modelos preditivos de distribuição de espécies são usados em muitos estudos atuais para classificar as áreas com base em condições ambientais, avaliando as similaridades para determinar se um local é considerado adequado ambientalmente ou não para a ocorrência de determinada espécie (CERON *et al.*, 2021; PETERSON & SOBERÓN, 2012).

Na prática, a metodologia envolve a aplicação de algoritmos como o Maxent (PHILLIPS *et al.*, 2006) ou Máquinas de Vetores de Suporte (SVM) (Elith *et al.*, 2008), combinando dados de ocorrência de espécies com informações ambientais. Esses modelos têm sido fundamentais em estudos que abrangem desde a resposta das espécies às mudanças climáticas até a identificação de áreas prioritárias para conservação (ARAÚJO & PETERSON, 2012; AMARAL; FERREIRA & SILVA-MANN, 2021).

Apesar do sucesso observado com esta abordagem, desafios persistem na modelagem de distribuição de espécies, incluindo a necessidade de dados robustos e a consideração de dinâmicas ambientais complexas. Conforme destacado por Guisan & Thuiller (2005), superar esses desafios é vital para melhorar a precisão e a aplicabilidade desses modelos no contexto da conservação da biodiversidade.

Em conclusão, a modelagem de distribuição de espécies tem sido muito importante em vários aspectos, como prever efeitos das mudanças climáticas, avaliar a adequação ambiental do habitat e prever o potencial de invasão de espécies exóticas, apoiando a priorização de áreas de conservação (CABRERA *et al.*, 2020; CERON *et al.*, 2021).

2.4 Lacunas do conhecimento

É fundamental que conheçamos a diversidade biológica do nosso planeta, dada a sua grande importância, mas ainda existem muitas lacunas em nosso conhecimento sobre ela (HORTAL *et al.*, 2015; MAGURRAN, 2013). A maior parte da diversidade biológica permanece desconhecida e incompreendida (WILSON, 1985). A diversidade biológica, também chamada de riqueza de espécies, constitui um dos principais componentes de uma comunidade biológica, nos permitindo mensurar a contribuição de indivíduos de espécies diferentes para toda a comunidade (LEIMIG, 2020). A diferença existente entre a velocidade e complexidade em que se dá a produção de novas entidades e a velocidade em que podemos descrevê-las, faz surgir lacunas no conhecimento da diversidade biológica (HORTAL *et al.*, 2015).

A variabilidade genética dentro de populações e espécies é fundamental para a sua adaptação e evolução, mas esta área apresenta desafios, e as lacunas desse conhecimento são chamadas de déficit darwiniano (HORTAL *et al.*, 2015). As mudanças climáticas rápidas adicionam uma complexidade adicional, e chamamos essa lacuna de déficit hutchinsoniano (HORTAL *et al.*, 2015), destacando a dificuldade em prever os impactos na biodiversidade devido às incertezas nas respostas ecológicas (WILLIS *et al.*, 2008). Algumas consequências das mudanças climáticas são irreversíveis, com mais de 50% de chance de um aumento da temperatura global de 1,5°C até 2024 (IPCC, 2023). Uma área de pesquisa emergente é o papel dos microbiomas em interações simbióticas, constituindo o déficit eltoniano (HORTAL *et al.*, 2015). A compreensão do papel dos microbiomas nas adaptações de organismos multicelulares permanece incompleta (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). O déficit raunkiaerano refere-se à falta de compreensão das características e funções das espécies, impulsionando abordagens baseadas em características funcionais na ecologia e evolução (HORTAL *et al.*, 2015). O déficit prestoniano destaca a lacuna no conhecimento sobre a abundância e dinâmica populacional das espécies, devido a desafios na produção de dados precisos e nos custos associados à coleta e análise (CARDOSO *et al.* 2011). O déficit linneano reside na lacuna da taxonomia e identificação de espécies, com muitas espécies ainda aguardando descoberta e descrição formal (HORTAL *et al.*, 2015).

Por fim, o conhecimento sobre a distribuição geográfica das espécies é

notavelmente incompleto, sendo essa lacuna chamada de déficit wallaceano (HORTAL *et al.*, 2015). O conhecimento da distribuição das espécies está diretamente relacionado à variação temporal e espacial no esforço de levantamento (HORTAL *et al.*, 2008; BOAKES *et al.*, 2010). Existem vastas áreas do globo ainda não exploradas, resultando em uma lacuna substancial em nosso conhecimento sobre a distribuição de muitas espécies (JETZ *et al.*, 2012). De fato, modelos preditivos sugerem um grande potencial para novas espécies de répteis serem descobertas especialmente para as florestas neotropicais e Indomalaias (Brasil, Indonésia, Madagascar e Colômbia) (MOURA & JETZ, 2021).

Os mapas precisos de distribuição de espécies são essenciais para reduzir o déficit wallacenano, mas para que se faça o registro de uma única serpente em campo, principalmente na região neotropical, geralmente exige um alto esforço amostral (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Em conclusão, abordar essas lacunas do conhecimento é imperativo para a conservação efetiva da biodiversidade. A urgência de preencher essas lacunas de distribuição não pode ser subestimada, pois o desconhecido representa um desafio direto para a sustentabilidade do nosso planeta (SALA *et al.*, 2000). E é sabido que mais espécies são extintas do que novas são descobertas (ZAMANI *et al.*, 2022)

2.5 *Lygophis* FITZINGER, 1843

O gênero de serpentes não peçonhentas *Lygophis* apresenta *Lygophis lineatus* (LINNAEUS, 1758) como espécie tipo (UETZ *et al.*, 2023). Oito espécies são alocadas neste gênero: *L. anomalus*; *L. dilepis*; *L. flavifrenatus*; *L. lineatus*; *L. meridionalis*; *L. paucidens*; *L. elegantissimus* e *L. vanzolinii*, todas terrestres e diurnas (CERON *et al.*, 2021). O gênero apresenta distribuição neotropical, desde o Panamá até a Argentina (CERON *et al.*, 2021; DIXON, 1989; UETZ *et al.*, 2023).

Análises filogenéticas utilizando dados moleculares e 246 espécies de serpentes (188 destas pertencentes à família Dipsadidae) recuperaram *Lygophis* monofilético (GRAZZIOTIN *et al.*, 2012). Este gênero pertence à tribo Xenodotini, a qual abriga também os gêneros *Xenodon* e *Erythrolamprus* (GRAZZIOTIN *et*

al., 2012; SERRANO *et al.*, 2020).

A recente coleta de exemplares de *Lygophis* nos municípios de Craíbas e Santana do Ipanema, no estado de Alagoas, Brasil gerou surpresa. A ausência de registros para o gênero em Alagoas, conforme documentado na Lista Brasileira de Répteis (GUEDES *et al.*, 2023), conflita com a recente descoberta. Uma análise preliminar da morfologia externa, dos indivíduos coletados em Alagoas, sugeriu uma grande afinidade com *L. paucidens*, aumentando ainda mais a incerteza sobre a identidade taxonômica desses exemplares pois de acordo com um estudo de modelagem de distribuição potencial do gênero *Lygophis*, o estado de Alagoas não apresenta adequabilidade ambiental para a ocorrência do gênero (CERON *et al.*, 2021).

Lygophis paucidens é encontrada predominantemente em áreas abertas de solo arenoso, com registros confirmados para o Paraguai e para a Diagonal Seca da América do Sul (CACCIALI *et al.*, 2013; CERON *et al.*, 2021; NOGUEIRA *et al.*, 2019; SERRANO *et al.*, 2020). No Brasil, nove estados apresentam registros da espécie: Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia e Minas Gerais (GUEDES *et al.*, 2023; UETZ *et al.*, 2023).

Morfologicamente, *L. paucidens* apresenta três linhas longitudinais escuras na região posterior do corpo que desaparecem repentinamente próximo à cabeça e possui o número de dentes superiores menor do que 13 (SERRANO *et al.*, 2020). A contagem de escamas dorsais, supralabiais, ventrais e subcaudais, conforme delineado por Cacciali *et al.* (2013), Dixon (1989), e Lema (1989), traz uma redução de escamas dorsais de 17-17-15, oito escamas supralabiais, de 165 a 174 escamas ventrais e de 62 a 74 escama subcaudais.

A escassez de espécimes de *L. paucidens* em coleções zoológicas pode sugerir uma lacuna no nosso conhecimento sobre sua distribuição geográfica (HOGE, 1952; DIXON, 1989). Este possível déficit wallaceano (NOGUEIRA *et al.*, 2019) ressalta a necessidade de pesquisas adicionais para preencher estas lacunas existentes.

A presença de *Lygophis* em Alagoas é inesperada pois o Estado não foi

considerado adequado ambientalmente para o gênero (CERON *et al.*, 2021). Ademais, lista de répteis do Brasil sugere a ausência deste gênero em Alagoas aumentando a incerteza sobre a identidade taxonômica dos exemplares coletados no Estado. A análise integrativa, abrangendo dados morfológicos (foliose) e dados moleculares (gene mitocondrial 16S rRNA e gene nuclear c-mos) será utilizada visando determinar a identificação taxonômica desses exemplares de serpentes recentemente coletados em Alagoas.

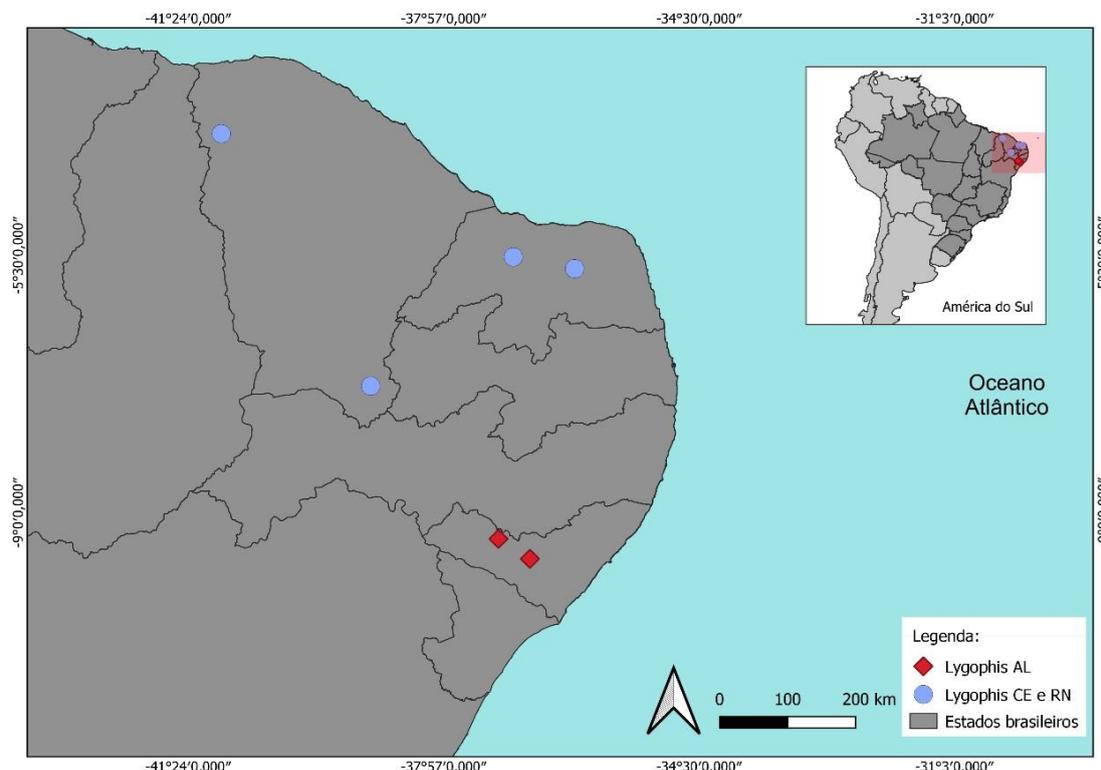
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material analisado

Dez espécimes previamente identificados como *Lygophis* sp. e provenientes de dois municípios do estado de Alagoas (Craíbas e Santana do Ipanema) foram analisados. Dez amostras de tecido hepático dos espécimes analisados morfologicamente foram utilizadas na abordagem molecular. Este material (espécimes e tecidos) já se encontravam incorporados à Coleção Herpetológica e ao Banco de Tecidos do MHN-UFAL. Desse modo, não houve a necessidade de solicitar anuência do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) ou da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA-UFAL). Adicionalmente quatro alíquotas de *Lygophis* cf. *dilepis* foram doadas pelo Prof. Dr. Adrian Garda, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (sendo duas do Ceará [CE] e duas do Rio Grande do Norte [RN]). Estas amostras de tecido foram e amplificadas aqui neste estudo (**Figura 2**).

Toda a caracterização morfológica e molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Integrativa da UFAL (LABI-ICBS).

Figura 2. Mapa da região Nordeste do Brasil destacando as localidades cujos espécimes de *Lygophis* foram coletados. Losangos em vermelho representam os municípios alagoanos em que os espécimes foram coletados (Craíbas e Santana do Ipanema). Círculos azuis representam os municípios do Ceará (Milagres e Ubajara) e Rio Grande do Norte (Açú e Lajes) onde os espécimes de *Lygophis* foram coletados. Mapa elaborado por Bruna Barbosa. Inset Mapa da América do Sul destacando os estados do Brasil.

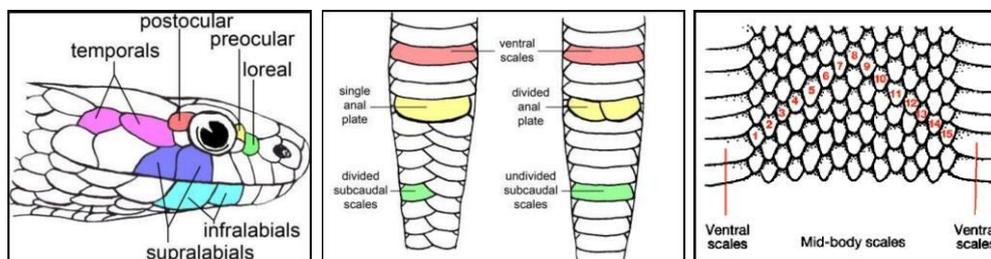


3.1.1 Abordagem morfológica

Os espécimes foram sexados através de uma incisão ventral para a inspeção gonadal. Dez caracteres merísticos foram aferidos com o auxílio de um microscópio estereoscópico: o número de escamas ventrais (EV), o número de escamas subcaudais (ESC), o número de escamas dorsais no terço anterior (EDA), o número de escamas dorsais no meio do corpo (EDM), o número de escamas dorsais no terço posterior (EDP), o número de escamas supralabiais (ESL), o número de escamas infralabiais (EIL), placa anal (PA), o número de escamas póstemporais (NPT) e o número de escamas pré-oculares (NPrO) (**Figura 3**). Os caracteres aferidos foram propostos por Dixon (1989) e Lema (1989). Além disso, foram aferidos quatro caracteres morfométricos, com o auxílio de uma fita métrica e de um paquímetro digital: o comprimento rostro-cloacal (CRC), o comprimento da cauda (CC), a largura da cabeça (LCa) e o

comprimento da cabeça (CCa).

Figura 3. Esquema ilustrando alguns dos principais conjuntos de escamas (caracteres merísticos) que são analisados em estudos taxonômicos de serpentes. O número de escamas supralabiais, de escamas ventrais, de subcaudais e três fileiras de escamas dorsais foram contabilizadas neste estudo sobre as *Lygophis* de Alagoas



Fonte: Bernarde, 2014

Para verificar se há dimorfismo sexual em *Lygophis paucidens* foi realizada uma análise de variância (ANOVA), para identificar se há divergências significativas entre os caracteres morfométricos de machos e fêmeas. Todas as análises foram feitas separadamente para cada caráter. A análise estatística foi realizada utilizando o software R (RStudio Team, 2023).

3.1.2 Abordagem molecular

O DNA genômico total foi extraído de dez amostras hepáticas, utilizando o método Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989). As extrações de DNA foram quantificadas e avaliadas quanto a sua pureza utilizando um espectrofotômetro nanodrop. Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram realizadas para a amplificação de um fragmento de 318 pb do gene mitocondrial 16S rRNA, e de 360 pb do gene nuclear c-mos, utilizando os primers de Palumbi (1991) e de Mott e Vieites (2009) respectivamente. A presença de *amplicons* foi aferida através de uma eletroforese em gel de agarose 1% corada com Sybr safe e visualizada em um transluminador com luz ultravioleta. As amostras funcionais foram purificadas com isopropanol e enviadas para serem sequenciadas (*forward*) pela empresa ACT Gene. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas com sequências disponíveis no banco de dados genéticos online

GenBank utilizando o software BioEdit 7.2.5.0 (HALL, 2011). No software MEGA (TAMURA *et al.*, 2021), foi calculada a distância genética p intraespecífica e interespecífica. O melhor modelo evolutivo para cada gene separadamente foi determinado no software PartitionFinder 2.1.1 (LANFEAR *et al.*, 2012). A sequência da espécie *Psomophis genimaculatus* foi utilizada para enraizar a árvore com as sequências do gene 16S rRNA, enquanto que a sequência da espécie *Magliophis exiguum* foi utilizada para enraizar a árvore com as sequências do gene nuclear c-mos. A escolha das espécies utilizadas para o grupo externo foi baseada no estudo de Grazziotin *et al.* (2012) e na disponibilidade de sequências no GenBank. A análise bayesiana foi realizada no software Mr. Bayes 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) utilizando duas análises independentes, com um milhão de gerações cada. Um consenso de maioria (*majority consensus*) foi obtido para gerar uma topologia após o descarte de 25% das árvores iniciais (*burn-in*). A árvore gerada foi visualizada e analisada com o software FigTree v1.3.1. Os grupos com probabilidade posterior (PP) acima de 0,95 foram considerados com alto suporte estatístico e são apresentados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Abordagem morfológica

Os indivíduos apresentaram folidose de 17 escamas dorsais no terço anterior (EDA), 17 escamas dorsais no meio do corpo (EDM), 15 escamas dorsais no terço posterior (EDP), oito escamas supralabiais (ESL), de 165 à 172 escamas ventrais (EV), de 62 à 74 escamas subcaudais (ESC), uma escama pré-ocular (EPrO), duas escamas pós-temporais (NPT), nove escamas infra-labiais (EIL) e placa anal inteira (PA) (**Tabela 1**). Tais contagens se encaixam na folidose diagnóstica da espécie *L. paucidens*, proposta por Dixon (1989) e Lema (1989). Além disso os espécimes apresentaram valores de CRC entre 250 milímetros e 380 milímetros, CC de 66 milímetros a 135 milímetros, CCa de 9,8 milímetros a 20,63 milímetros e LCa de 4,74 milímetros a 10,78 milímetros que se encaixam nos valores conhecidos para *L. paucidens* (**Tabela 2**).

As *Lygophis* coletadas em Alagoas não apresentaram dimorfismo sexual, isto é, os valores não foram significativos em relação ao comprimento rostro-cloacal (ANOVA, $F_{1,3} = 0,018$; $P = >0,895$), comprimento da cabeça (ANOVA, $F_{1,3} = 0,051$; $P = >0,826$), Largura da cabeça (ANOVA, $F_{1,3} = 0,123$; $P = >0,735$) e comprimento do corpo (ANOVA, $F_{1,3} = 0,183$; $P = >0,68$) (**Tabela 3**)

Tabela 1. Caracteres merísticos aferidos nas *Lygophis* coletados no estado de Alagoas, Brasil. Na tabela apenas os caracteres que apresentam variação estão expressos. Número de escamas ventrais (EV), número de escamas subcaudais (ESC). Exemplos MHNUFAL 16145, 16146, 17758, 17759, 17760 e 17764 são machos e os exemplares MHNUFAL 17761, 17765, 17766 e 17767 são fêmeas. Indivíduo de Santana do Ipanema está destacado com um asterisco, todos os outros são provenientes do município de Craíbas. Hífen representa ausência de dado devido a impossibilidade de aferir o caráter.

Voucher	Sexo	Ventrais	Subcaudais
MHNUFAL 16145	Macho	165	67
MHNUFAL 16146	Macho	170	-
MHNUFAL 17758	Macho	171	67
MHNUFAL 17759	Macho	167	-
MHNUFAL 17760 *	Macho	165	73
MHNUFAL 17761	Fêmea	167	63
MHNUFAL 17764	Macho	172	74

MHNUFAL 17765	Fêmea	166	68
MHNUFAL 17766	Fêmea	165	67
MHNUFAL 17767	Fêmea	163	62

Tabela 2. Caracteres morfométricos de *Lygophis* coletados no estado de Alagoas, Brasil. Valores em milímetros (mm). Comprimento do Corpo (CC), Comprimento da Cabeça (CCa), Largura da Cabeça (LCa) e Comprimento Rostro-Cloacal. Asterisco é o exemplar coletado do município de Santana do Ipanema, os outros exemplares foram coletados em Craíbas. Hífen representa ausência de dado devido a impossibilidade de aferir o caráter

Voucher	CC	CCa	LCa	CRC
MHNUFAL 16145	77	12,36	9,92	260
MHNUFAL 16146	-	13,62	8,25	320
MHNUFAL 17758	118	15,07	8,15	380
MHNUFAL 17759	66	14,18	7,64	360
MHNUFAL 17760*	135	13,98	8,36	360
MHNUFAL 17761	86	13,64	7,86	295
MHNUFAL 17764	100	15,85	6,49	305
MHNUFAL 17765	78	9,8	4,74	250
MHNUFAL 17766	110	13,69	6,1	340
MHNUFAL 17767	150	20,63	10,78	490

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) utilizando quatro caracteres morfométricos para os indivíduos fêmeas e machos de *Lygophis* do estado de Alagoas, Brasil. (N total=10; N fêmeas=4; N machos=6).

Caracteres	F	p	Graus de Liberdade
CRC	0,018	0,895	1,3
CCa	0,051	0,826	1,3
LCa	0,123	0,735	1,3
CC	0,183	0,68	1,3

4.2 Abordagem molecular

Das dez amostras que tiveram o DNA genômico total extraído, três não apresentaram concentração ou pureza suficiente para a amplificação (**Tabela 4**). Sete amostras de tecido tiveram um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA amplificado com sucesso, e dessas sete amostras, três tiveram um fragmento de 360 pares de base do gene nuclear c-mos amplificado com sucesso. Seis das amostras amplificadas são provenientes do município de Craíbas, e uma do município de Santana do Ipanema, Estado de Alagoas, Brasil.

Tabela 4. Concentração e pureza das extrações de DNA genômico total obtido de tecidos hepáticos de sete exemplares de *Lygophis* coletados no estado de Alagoas, Brasil.

Voucher	260/280	Concentração
MNHUFAL 17758	1,63	65,16
MHNUFAL 17759	1,82	88,52
MNHUFAL 17760	1,95	115,96
MNHUFAL 17764	1,80	117,96
MNHUFAL 17765	1,63	51,27
MHNUFAL 17766	1,77	33,37
MHNUFAL 17767	1,96	46,19

As sequências do gene mitocondrial 16S rRNA que foram obtidas neste estudo foram alinhadas com outras seis sequências de congêneres. Duas destas sequências estavam disponíveis no GenBank (*L. dilepis* da localidade tipo e *L. elegantissimus* de localidade desconhecida) e quatro outras sequências foram provenientes de alíquotas doadas pelo Prof. Dr. Adrian Garda, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (duas do Ceará [CE] e duas do Rio Grande do Norte [RN] e amplificadas aqui neste estudo. Além disso foi adicionado uma sequência de uma espécie para cada gênero irmão de *Lygophis* (*Xenodon* do Panamá e *Erythrolamprus* de Araçariçuama, São Paulo).

Não houve divergência intraespecífica entre as sequências de *Lygophis* de Alagoas. As sequências de *Lygophis* do CE e do RN apresentaram haplótipos idênticos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Distância genética p intraespecífica para as espécies do gênero *Lygophis* utilizadas na filogenia apresentada neste estudo. Distância calculada a partir de um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA.

<i>Lygophis</i> - AL (7)	0%
<i>Lygophis</i> - CE e RN (4)	0%
<i>Lygophis dilepis</i> (1)	n/c
<i>Lygophis elegantissimus</i> (1)	n/c
<i>Erythrolamprus aesculapii</i> (1)	n/c
<i>Psomophis genimaculatus</i> (1)	n/c
<i>Xenodon rabdocephalus</i> (1)	n/c

Houve uma divergência genética de 6,8% entre as *Lygophis* coletadas em Alagoas e a sequência de *Lygophis dilepis* da localidade tipo que estava disponível no GenBank (**Tabela 6**).

Tabela 6. Distância genética p interespecífica para algumas das espécies do gênero *Lygophis* utilizadas em uma das filogenias apresentada neste estudo. Distância calculada a partir de um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA. Os nomes em negrito representam as sequências geradas neste estudo.

Espécies	1	2	3	4	5	6
1 <i>Lygophis</i> (AL) (7)						
2 <i>Lygophis</i> (CE e RN) (4)	3,6%					
3 <i>Lygophis dilepis</i> (1)	6,8%	7,3%				
4 <i>Lygophis elegantissimus</i> (1)	10%	9,4%	10%			
5 <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (1)	11%	9,9%	12%	10%		
6 <i>Psomophis genimaculatus</i> (1)	13%	13%	13%	16%	14%	
7 <i>Xenodon rabdocephalus</i> (1)	11%	9,1%	12%	10%	8,3%	13%

Entre os exemplares de *Lygophis* coletados em Alagoas e a sequência de c-mos de *Lygophis paucidens* disponível no GenBank, a divergência foi de 0% (**Tabela 7**).

Tabela 7. Distância genética p interespecífica para algumas das espécies do gênero *Lygophis* utilizadas em uma das filogenias apresentada neste estudo. Distância calculada a partir de um fragmento de 360 pares de base do gene nuclear c-mos. Os nomes em negrito representam as sequências geradas neste estudo.

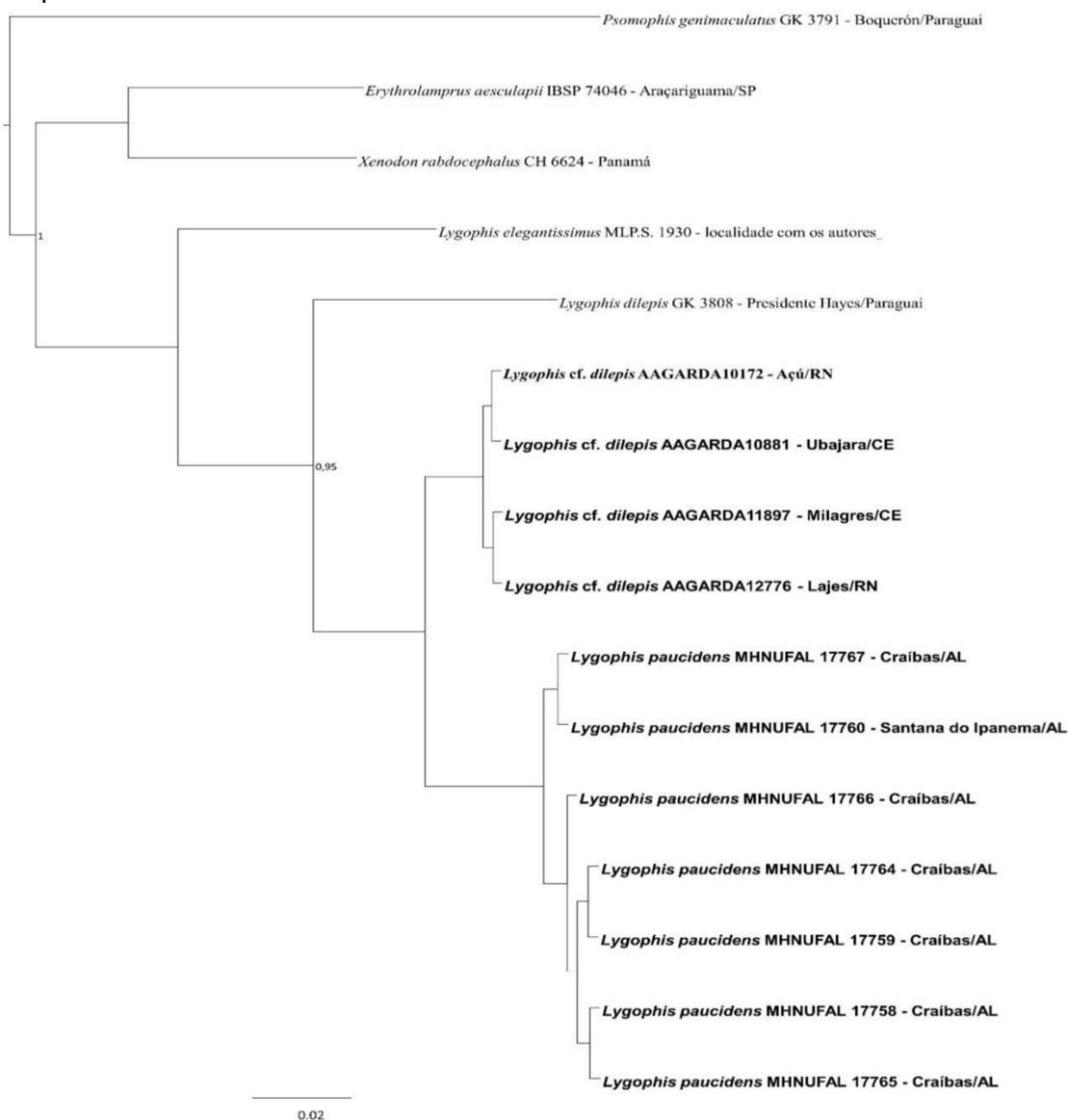
Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Lygophis</i> (AL) (3)								
2 <i>Lygophis</i> (CE) (1)	0,9%							
3 <i>Lygophis paucidens</i> (1)	0%	0,8%						
4 <i>Lygophis lineatus</i> (1)	3,2%	2,2%	3,1%					
5 <i>Lygophis meridionalis</i> (1)	2,9%	1,9%	2,8%	2,5%				
6 <i>Lygophis elegantissimus</i> (1)	2,9%	1,9%	2,8%	1,9%	2,2%			
7 <i>Xenodon merremi</i> (1)	5%	4,6%	4,9%	4,6%	4,3%	3,7%		
8 <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (1)	5%	4,6%	4,9%	4,6%	4,9%	3,4%	3,7%	
9 <i>Magliophis exiguum</i> (1)	3,8%	3,4%	3,7%	3,4%	3,7%	2,5%	1,4%	2,2%

Para a matriz gerada a partir do gene 16S rRNA o melhor esquema de particionamento dos dados foi TRN+G por InL e BIC.

A filogenia para o gene 16S rRNA apresentada na **Figura 4**, traz as *Lygophis* de Alagoas recuperadas como grupo monofilético. *Lygophis* do CE e

do RN foram agrupadas juntas. *Lygophis* de Alagoas agruparam-se como grupo irmão do clado formado pelas *Lygophis* do CE e RN. *Lygophis dilepis* da localidade tipo (Presidente Hayes, Paraguai) foi recuperada grupo irmão do grupo composto pelas *Lygophis* de Alagoas juntamente com as *Lygophis* de CE e RN com um suporte de 0,95 de pp. A sequência de *Lygophis elegantissimus* foi recuperada grupo irmão do clado formado pelas sequências de Alagoas, Ceará, Rio Grande do Norte e pela sequência de *Lygophis dilepis* da localidade tipo. As sequências de *Xenodon rabdocephalus* e *Erythrolamprus aesculapii* foram agrupadas juntas entre si, mas separadas das sequências do gênero *Lygophis*, com um suporte estatístico de 1 de probabilidade posterior. A árvore foi enraizada com a sequência de *Psomophis genimaculatus*.

Figura 4. Relações filogenéticas de *Lygophis* spp. estimadas através de uma inferência Bayesiana utilizando um fragmento de 318 pares de base do gene mitocondrial 16S rRNA. Valores de probabilidades posteriores acima de 0,95 foram considerados significativos e são apresentados na filogenia. Os espécimes em negrito foram sequenciados neste estudo.

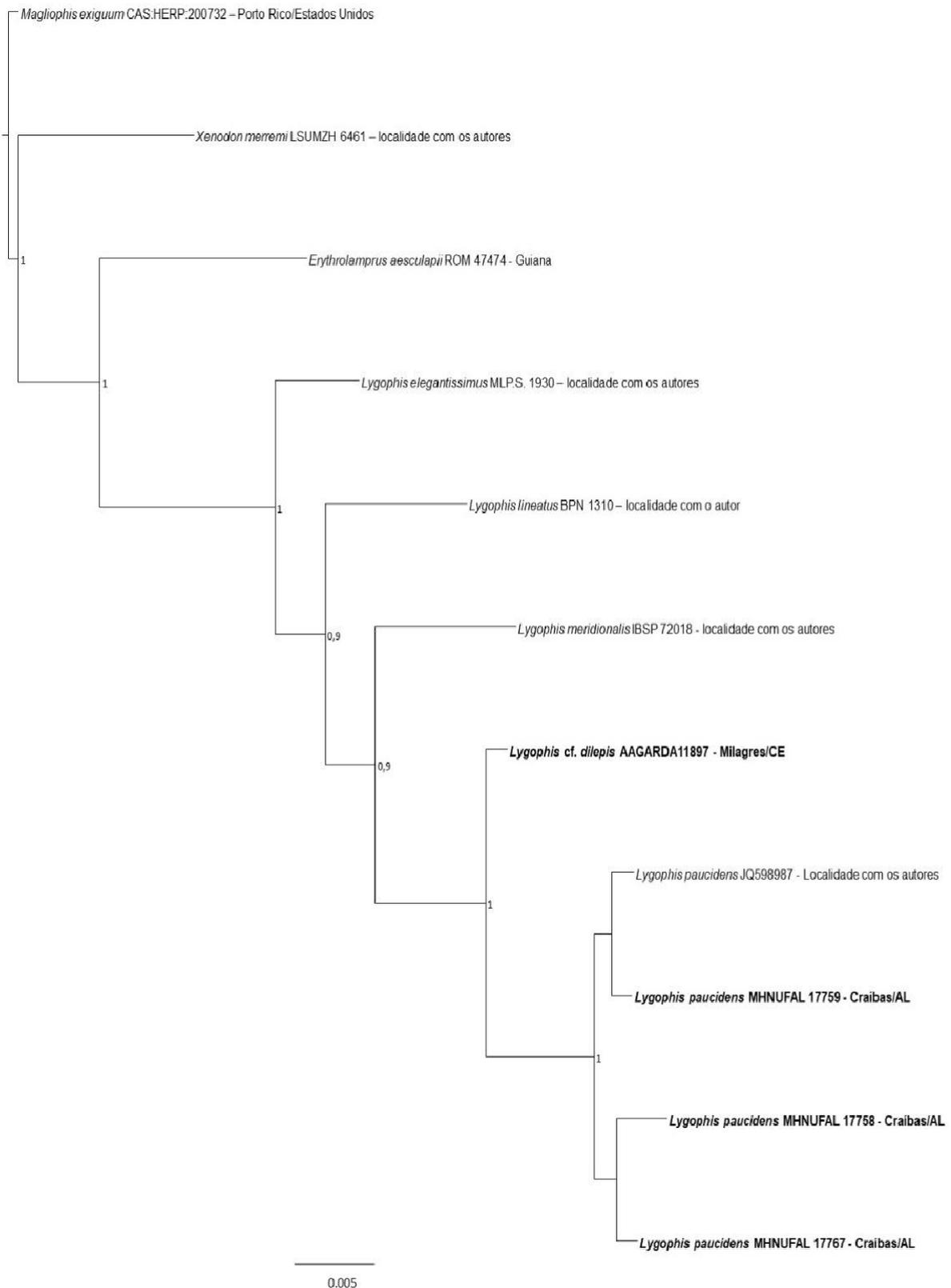


As sequências amplificadas nesse estudo para o gene c-mos foram alinhadas com outras cinco sequências do mesmo gênero, sendo quatro que estavam disponíveis no Genbank e uma proveniente de uma das amostras de tecido cedidas pelo Prof. Dr. Adrian Garda, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Foram adicionadas duas sequências, sendo uma de cada gênero irmão de *Lygophis*.

Para a matriz gerada a partir do gene c-mos o melhor modelo evolutivo foi

o HKY por InL e BIC. A árvore filogenética gerada a partir do gene nuclear c-mos e apresentada na **figura 5**, agrupou as *Lygophis* de Alagoas juntas com a *Lygophis paucidens* que estava disponível no Genbank, com um suporte estatístico de 1 de pp. A sequência de uma das *Lygophis* cedidas pelo professor Adrian Garda foi recuperada grupo irmão do clado composto pelas *Lygophis* de Alagoas e pela *Lygophis paucidens* do Genbank, com suporte estatístico de 1 de probabilidade posterior. Todas as sequências de *Lygophis* juntas formaram um clado irmão da sequência de *Erythrolamprus aesculapii*, com 0,9 de probabilidade posterior. *Xenodon merremi* foi recuperada grupo irmão do clado formado pelas *Lygophis* e pela *Erythrolamprus aesculapii*. A árvore foi enraizada com *Magliophis exiguum*.

Figura 5. Relações filogenéticas de *Lygophis* spp. estimadas através de uma inferência Bayesiana utilizando um fragmento de 380 pares de base do gene nuclear c-mos. Valores de probabilidades posteriores acima de 0,95 foram considerados significativos e são apresentados na filogenia. Os espécimes em negrito foram sequenciados neste estudo.



As cinco sequências de *Lygophis* provenientes dos exemplares de Açú e Lajes (RN) e de Ubajara e Milagres (CE), haviam sido previamente identificadas como *Lygophis* cf. *dilepis*. Entretanto, estes indivíduos do RN e CE não puderam ter a sua morfologia verificada. Desse modo, sua identificação ainda precisa ser confirmada. Não há sequências no Genbank do mesmo marcador para *L. dilepis* e *L. paucidens* e isso dificulta a verificação da divergência genética destes exemplares de AL, CE e RN.

Os exemplares de *Lygophis* coletados nos municípios de Craíbas e Santana do Ipanema, Alagoas, Brasil apresentaram 6,8% de divergência genética no fragmento de 16S rRNA com a *Lygophis dilepis* da localidade tipo. Quando comparadas com a sequência de c-mos *Lygophis paucidens* disponível no GenBank, a divergência com os indivíduos de Alagoas foi de 0%. Como para estes exemplares houve verificação da morfologia e a foliose se encaixou perfeitamente na diagnose de *L. paucidens* é possível afirmar utilizando o critério tanto da acumulação como da congruência da taxonomia integrativa que *L. paucidens* ocorre em Alagoas.

Esse estudo confirma o primeiro registro de *Lygophis paucidens* para o estado de Alagoas, ampliando a distribuição da espécie em 620 km Nordeste de sua ocorrência mais próxima, no município de Gentio do Ouro, Bahia, Brasil, contribuindo desse modo para a redução do déficit wallaceano.

5 CONCLUSÃO

A ocorrência de *Lygophis paucidens* é confirmada para o estado de Alagoas.

A presença de *Lygophis paucidens* em Santana do Ipanema amplia a sua distribuição em 620 km na direção nordeste de sua localidade de ocorrência mais próxima (Cidade de Gentio do Ouro, estado da Bahia, Brasil).

Indivíduos de *Lygophis* obtidos nos estados de Ceará e Rio Grande do Norte e previamente identificados morfologicamente como *Lygophis* cf. *dilepis* precisam ter a sua morfologia revisitada para a determinação de sua identificação taxonômica.

Não foi identificado dimorfismo sexual entre os espécimes de *Lygophis paucidens* de Alagoas.

A integração de diferentes abordagens, como a morfológica e a molecular, é importante para determinar o status taxonômico de espécies.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. A.; FERREIRA, R. A.; MANN, R. S. 2021. The use of species distribution modeling for forest restoration: A systematic review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8.
- ANDENA, S. R. 2014. Why Brazil is not ready for the Twenty-First Century Taxonomy: a zoological view. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-7.
- ARAÚJO, M. B.; PETERSON, A. T. 2012. Uses and misuses of bioclimatic envelope modeling. **Ecology**, v. 93, n. 7, p. 1527-1539.
- ASZTALOS et al. 2021. It takes two to tango – Phylogeography, taxonomy and hybridization in grass snakes and dice snakes (Serpentes: Natricidae: Natricinae, *N. tessellata*). **Vertebrate Zoology**, v. 71, p. 813-834
- AZEVEDO et al. 2024. Integrated evidence sheds light on the taxonomy of the widespread *Tantilla melanocephala* species complex (Serpentes: Colubridae) and indicates the existence of a new species from southern South America. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 24, p. 119-147.
- BENEDITO, A. 2017. Biologia e Ecologia dos Vertebrados. **Editora Roca**, v. 1, p. 220-221
- BHASKAR, R.; SHARON, E. A.; GANESH, S. R. 2023. DNA barcoding of snake from Chennai Snake Park using non-invasive sampling and non-toxic DNA isolation method. **Proceedings of the 2nd Annual Research Conference**, p. 16-17.
- BICUDO, C. 2004. Taxonomia. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 1, p 1-2.
- BOAKES et al. 2010. Distorted Views of Biodiversity: Spatial and Temporal Bias in Species Occurrence Data. **PLoS Biol**, v. 8, n. 6.
- BRANDLEY, M. C.; HUELSENBECK, J. P.; WIENS, J. J. 2008. Rates and Patterns in the Evolution of Snake-Like Body Form in Squamate Reptiles: Evidence for Repeated Re-Evolution of Lost Digits and Long-Term Persistence of Intermediate Body Forms. **Evolution**, v. 62, p. 2042-2064.
- CACCIALI, P.; BUONGERMINI, E.; KÖHLER G. 2019. Barcoding Analysis of Paraguayan Squamata. **Diversity**, v. 11, p. 152.
- CACCIALI et al. 2013. Reptilia, Squamata, Serpentes, *Lygophis paucidens* Hoge, 1952: first records for Paraguay. **Check List** v. 9, n. 1, p. 131-132.
- CARDOSO et al. 2011. The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. **Biological Conservation**, v. 144, p. 2647-2655.
- CERON et al. 2021. Ecological Niche Explains the Sympatric Occurrence of

Lined Ground Snakes of the Genus *Lygophis* (Serpentes, Dipsadidae) in the South American Dry Diagonal. **Herpetologica** v. 77, n. 3, p. 239-248.

CHANEY et al. 2024. Phylogenetics and Integrative Taxonomy of African Water Snakes (Squamata: Colubridae: Grayia). **Herpetological Monographs**, v. 38, n. 1, p. 1-52.

COLEMAN, C. O. 2015. Taxonomy in times of the taxonomic impediment – examples from the community of experts on amphipod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, v. 35, n. 6, p. 729-740.

DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407-415.

DIXON, J. R. 1989. A key and checklist to the neotropical snake genus *Liophis* with country lists and maps. **Smithsonian Herpetological Information Service**, n. 79.

DUQUE et al. 2023. Venomous snakes of medical importance in the Brazilian state of Rio de Janeiro: habitat and taxonomy against ophidism. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83.

EDWARDS, D. L.; KNOWLES, L. L. 2014. Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy?. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281:

ELITH, J.; LEATHWICK, J. R.; HASTIE, T. 2008. A working guide to boosted regression trees. **Journal of Animal Ecology**, v. 77, p. 802-813.

ENGEL et al. 2021. The taxonomic impediment: a shortage of taxonomists, not the lack of technical approaches. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 193, p. 381-387.

FONSECA, A. T. 2020. Ernst Mayr e a história da biologia: críticas e proposta de revisão. **Revista Helius**, v. 3, n. 2.

GAUTHIER et al. 2012. Assembling the Squamate Tree of Life: Perspectives from the Phenotype and the Fossil Record. **Bulletin of the Peabody Museum of Natural History**, v. 53, n. 1, p. 3-308.

GOUVEIA, R. V. 2013. Estudo sobre a foliose, morfometria e dimorfismo sexual de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1858) (SQUAMATA, COLUBRIDAE). **Universidade Federal de Juíz de Fora**. Dissertação de mestrado.

GRAZZIOTIN et al. 2012. Molecular phylogeny of the New World Dipsadidae (Serpentes: Colubroidea): a reappraisal. **Cladistics** n. 28, p. 437-459.

GREENE, H. W. 1997. Snakes. **University of California Press**. 1ed.

GUEDES, T. B.; ENTIAUSPE-NETO, O. M.; COSTA, H. C. 2023. Lista de répteis

do Brasil: atualização de 2022. **Herpetologia Brasileira**, v. 12, n. 1.

GUISAN, A. THUILLER, W. ZIMMERMANN, N. E. 2000. Habitat Suitability and Distribution Models: With Applications in R. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 6, n. 11, p. 951-952.

GUISAN, A.; THUILLER, W. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. **Ecology Letters**, v. 8, n. 10, p. 993-1009.

GUISAN, A.; ZIMMERMANN, N. E. 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. **Ecological Modelling**, v. 135, n. 2-3, p. 147-186.

HAJIBABAEI et al. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, p. 167-172.

Hall, T. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**. v. 2, n. 1, p. 60-61.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences (Suplemento)**, v. 270, p. S96-S99.

HILLIS, D. M.; WILCOX, T. P. 2004. Phylogeny of the New World true frogs (Rana). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, p. 299-314.

HOGUE, A. R. 1952. Notes on *Lygophis* Fitzinger. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 24, n. 2, p. 245-268.

HORTAL et al. 2015. Seven Shortfalls that Beset Large-Scale Knowledge of Biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, p. 523-549.

HORTAL et al. 2015. Seven Shortfalls that Beset Large-Scale Knowledge of Biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 46, p. 523-549.

IPCC 2023: MASSON-DELMOTTE et al. Climate Change 2023: The Physical Science Basis. Contribution Of Working Group I To The Seventh Assessment Report Of The Intergovernmental Panel On Climate Change, v. 1, 2023.

JETZ et al. 2012. The global diversity of birds in space and time. **Nature**, v. 491, p. 444-448.

KOBLMÜLLER, S. 2023. DNA Barcodes for Evolution and Biodiversity. **Diversity**, v. 15, p. 1003.

LANFEAR, R. C. B.; HO, S. Y.; GUINDON, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic

analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 6, p. 1695-1701

LEIMIG, R. A.; ROSSA, D. C. 2020. Riqueza e Diversidade Biológica em Foz e Região. **ResearchGate**.

LEMA, T. 1989. Serpentes do complexo *Liophis lineatus* (Lineu, 1758) no Brasil Nordeste (Serpentes, Colubridae: Colubrinae). **Acta Biologica Leopoldensia** v. 11, p. 251-271.

MAGURRAN, A.E. 2013. Ecological Diversity and Its Measurement. **Springer**, p. 54-62.

MOURA, M. R.; JETZ, W. 2021. Shortfalls and opportunities in terrestrial vertebrate species discovery. **Nature Ecology and Evolution**, v. 5, n. 5, p. 631-639.

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

PADIAL et al. 2010. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, p. 16.

PALUMBI et al. 1991. The simple fool's guide to PCR, ver. 2.0. **University of Hawaii, Honolulu** p. 25-28.

PEARSON, R. G. DAWSON, T. P. 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful?. **Global Ecology & Biogeography**, v. 12, p. 361-371.

PERE et al. 2023. Molecular Discrimination and Phylogenetic Relationships of Physalis Species Based on ITS2 and rbcL DNA Barcode Sequence. **Crops**, v. 3, p. 302-319.

PETERSON A. T.; SOBERÓN J. 2012. Species Distribution Modeling and Ecological Niche Modeling: Getting the Concepts Right. **Natureza & Conservação**, v. 10, n. 2, p. 102-107.

PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, v. 190, n. 3-4, p. 231-259.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. 2008. A Vida dos Vertebrados. **Atheneu Editora São Paulo**. 4ed. p. 336-341.

PYRON, R. A. 2017. Novel Approaches for Phylogenetic Inference from Morphological Data and Total-Evidence Dating in Squamate Reptiles (Lizards, Snakes, and Amphisbaenians). **SYSTEMATIC BIOLOGY**, v. 66, n. 1, p. 38-56.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. A.; WIENS, J. J. 2013. A phylogeny and revised

classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 93

PYRON et al. 2014. Effectiveness of phylogenomic data and coalescent species-tree methods for resolving difficult nodes in the phylogeny of advanced snakes (Serpentes: Caenophidia). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 221-231.

PYRON, R. A.; WALLACH, V. 2011. Systematics of the blindsnakes (Serpentes: Scolecophidia: Typhlopoidea) based on molecular and morphological evidence. **Zootaxa**, v. 3829, n. 1, p. 1-81.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. 2007. bold: The Barcode of Life Data System. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364.

REEDER et al. 2015. Integrated Analyses Resolve Conflicts over Squamate Reptile Phylogeny and Reveal Unexpected Placements for Fossil Taxa. **PLOS ONE**, v. 10, n.3.

RENDOŠ et al. 2023. First insight into molecular diversity and DNA barcode library of epikarst-dwelling invertebrates in the Western Carpathians. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 23, n4, p. 588-601.

ROCHA ALEXANDRE, B. DA LORINI, M. L. DE VIVEIROS GRELLE, C. E. 2013. Modelagem preditiva de distribuição de espécies ameaçadas de extinção: um panorama das pesquisas. **Oecologia Australis**, v. 17, n. 4, p. 483-508.

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

BOOM et al. 2012. Mapping the biosphere: exploring species to understand the origin, organization and sustainability of biodiversity. **Systematics and Biodiversity**, v. 10, n. 1, p. 1-20.

SALA et al. 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. **SCIENCE**, v. 287, n. 5459, p. 1770-1774.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold spring harbor laboratory press**, n. 2.

SCHLICK-STEINER et al. 2010. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 421-438.

SERRANO et al. 2020. Mapping local and regional distribution of *Lygophis paucidens* Hoge, 1952 (Serpentes, Dipsadidae), an elusive snake from the sandy savannas of Brazil and Paraguay. **Check List** v. 16, n. 1, p. 75-81.

SIGWART, J. D.; GARBETT, A. 2018. Biodiversity Assessment, DNA Barcoding, and the Minority Majority. **Integrative and Comparative Biology**, v. 58, n. 6, p.

1146-1156.

SUEIRO et al. 2010. Anomalias cromáticas em *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): Xantismo interfere na sobrevivência?. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 155-160.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. 2021. Mega11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027.

TITLE et al. 2024. The macroevolutionary singularity of snakes. **Science**, v. 383, p. 918-923.

TOWNSEND et al. 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 735-757

UETZ et al. 2023. (eds.) The Reptile Database. Disponível em <http://www.reptile-database.org>. acessado em 2023.

VAN STADEN et al. 2023. Molecular Taxonomy of South Africa's Catsharks: How Far Have We Come? **Diversity**, v. 15, p. 826.

VANDENKOORNHUYSE et al. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, p. 1196-1206.

WÄGELE et al. 2011. The taxonomist - an endangered race. A practical proposal for its survival. **Frontiers in Zoology**, v. 8, p. 25.

WHEELER, Q. D. 2014. Are reports of the death of taxonomy an exaggeration?. **New Phytologist**, v. 201, p. 370-371.

WHEELER et al. (Eds.). 2000. Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate. **Columbia University Press**. 1ed. p. 148-152

WILLIS et al. 2008. Phylogenetic patterns of species loss in Thoreau's woods are driven by climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 17029-17033.

WILSON, E. O. 1985. The Biological Diversity Crisis. **BioScience**, v. 35, n. 11, p. 700-706.

ZAMANI et al. 2022. The future of zoological taxonomy is integrative, not minimalista. **Systematics and Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. 1-14.

