



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Filogenia das serpentes do grupo de *Phalotris lemniscatus*
(Serpentes, Colubridae) baseada em marcadores moleculares.**

Geiza Pontes Esteves

Orientador: Prof. Dr. Márcio Borges Martins

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
ao Instituto de Biociências – UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas

Porto Alegre
Dezembro de 2011

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todo o carinho, a compreensão em todos os momentos e pelo apoio em todas as minhas decisões.

À minha tia Gláucia, por ter me inspirado a seguir essa profissão e por me ajudar ao longo da graduação.

Aos meus colegas de graduação, pelas risadas, que impediram que muitas aulas se tornassem tão maçantes, e pelos momentos inesquecíveis que me propiciaram viver.

Ao Márcio por ter me possibilitado realizar esse projeto, pela orientação, pelo apoio e por tudo que ele me ensinou.

Ao Grazziotin, pela paciência em me explicar e me auxiliar, mesmo em momentos inoportunos, e por ter contribuído para que meu projeto se concretizasse.

À Fabiane, à Renata Fagundes e à Renata Perez, pela amizade, pelo suporte e pelo auxílio e orientação.

A todos os meus colegas de laboratório.

À Fundação Grupo O Boticário e ao CNPq – Programa PROTAX, pelo financiamento que possibilitou a realização do trabalho.

Ao CNPq, pelos equipamentos e pelo financiamento parcial fornecidos pelo proc. 479412/2008-1, coordenado por Luiz R. Malabarba.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é apresentado na forma de artigo, obedecendo às normas da revista ZOOTAXA para o envio de manuscritos (Anexo), excetuando-se as figuras, inseridas ao longo do texto, e o idioma utilizado (português).

Filogenia das serpentes do grupo de *Phalotris lemniscatus* (Serpentes, Colubridae) baseada em marcadores moleculares.

GEIZA PONTES ESTEVES ¹; FABIANE NORONHA ¹; MÁRCIO BORGES MARTINS ¹

¹Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

The subfamily Xenodontinae is a group of colubrid snakes restricted to the Americas, particularly South America, that includes the Elapomorphini tribe, a group very cohesive and morphologically distinct. The variability in the intra-specific pattern of body coloration is usually high in this tribe, which has resulted in controversial taxonomic limits in some of their groups, as in the taxa related to *Phalotris lemniscatus*, which have a complex taxonomic history. As a result of the great morphological variability, they have been described as new species or re-categorized, and its taxonomic position raised or lowered, every new work. The aim of this study is to analyze the phylogenetic relationships between the taxa related to *Phalotris lemniscatus* and *Phalotris reticulatus*, based on molecular markers in order to provide information in the systematics of this group. We used 29 tissue samples, representing four morphotypes (usually recognized as species or subspecies) from different geographic regions and one as outgroup, besides 4 taxa, also as outgroups, obtained from GenBank. We used the mitochondrial genes 12S, 16S and *Cyt b*, and the nuclear marker BDNF. The phylogenetic trees were inferred by the Parsimony and Bayesian analysis. The results did not corroborate the structure and the traditional nomenclature, indicated by the staining pattern of individuals. The four morphotypes recognized in the literature seem to result from a very recent process of geographical differentiation and still cannot be detected by genetic markers studied. Thus, the taxa related to *Phalotris lemniscatus*, currently treated as subspecies or even as different species, should be synonymized the nominal species.

RESUMO

A subfamília Xenodontinae é um grupo de Colubrídeos restrito às Américas, em especial à América do Sul, e que inclui a Tribo Elapomorphini, um agrupamento muito distinto e morfológicamente coeso dentre os Xenodontinae. A variabilidade no padrão de coloração intra-específica do corpo é usualmente alta nessa tribo, o que tem resultado em algumas delimitações taxonômicas controversas em alguns de seus grupos, a exemplo dos táxons relacionados à *Phalotris lemniscatus*, que têm um histórico taxonômico complexo. Por apresentarem uma grande variabilidade morfológica, elas vêm sendo descritas como novas espécies ou re-categorizadas, tendo sua posição taxonômica elevada ou rebaixada, a cada novo trabalho. O objetivo deste estudo é fazer uma análise das relações filogenéticas existentes entre os táxons relacionados a *Phalotris lemniscatus* e a *Phalotris reticulatus*, baseada em marcadores moleculares, visando fornecer informações que auxiliem no entendimento da sistemática desse grupo. Foram utilizadas 29 amostras de tecidos, representando quatro morfótipos (usualmente reconhecidos como espécies ou subespécies) de diferentes regiões geográficas e uma espécie do grupo externo, além de 4 espécies, também no grupo externo, obtidos do GenBank. Utilizou-se os genes mitocondriais 12S, 16S e *Cyt b*, além do marcador nuclear BDNF. As árvores filogenéticas foram inferidas por meio das análises de Parcimônia e Bayesiana. Os resultados

obtidos não corroboraram com a estruturação e com a nomenclatura tradicional, indicada pelo padrão de coloração dos indivíduos. Os quatro morfotipos reconhecidos na literatura parecem resultado de um processo de diferenciação geográfica muito recente e que ainda não pode ser detectado pelos marcadores genéticos estudados. Assim, os táxons relacionados a *Phalotris lemniscatus*, atualmente tratados como subespécies e até como espécies distintas, deveriam ser sinonimizados à espécie nominal.

Palavras-chave: *Phalotris reticulatus*, *Phalotris lemniscatus trilineatus*, *Phalotris lemniscatus divittatus*, *Phalotris lemniscatus iheringi*, Xenodontinae, Elapomorphi

1. INTRODUÇÃO

A subfamília Xenodontinae é um grupo de Colubrídeos restrito às Américas, em especial à América do Sul (FERRAREZZI 1993b). Pertencendo a esse grupo, podemos destacar a Tribo Elapomorphi, um agrupamento muito distinto e morfologicamente coeso dentro os Xenodontinae, que compartilham uma série de características não-usuais, como a fusão de placas cefálicas, a redução ocular e o fortalecimento do crânio, geralmente interpretadas como resultantes de adaptações aos hábitos fossoriais ou semi-subterrâneos (FERRAREZZI 1993b). Apresentam ainda algumas modificações, como uma grande redução dos ossos maxilares, a redução dos dentes prediastemais, seguidos por dois dentes maiores profundamente sulcados e o neurocrânio tubular e reforçado (HOFSTADLER-DEIQUES & LEMA 2005).

As espécies de elapomorfíneos se distribuem na América do Sul, a leste dos Andes, desde a Amazônia e a Caatinga ao norte, até o Cerrado, o Chaco, a Mata Atlântica, os Pampas e a Patagônia ao sul, ocupando desde florestas tropicais até regiões semi-áridas (FERRAREZZI 1993b; HOFSTADLER-DEIQUES & LEMA 2005). São referidas como serpentes de pequeno porte, com hábito fossorial ou semi-subterrâneo e que vivem a maior parte do tempo sob o solo ou sob o folhiço, em galerias que cavam ativamente ou que foram produzidas por outros animais ou pela decomposição de raízes (FERRAREZZI 1993b).

Muitos Elapomorphi apresentam coloração aposemática, geralmente conferida pelo dorso vermelho uniforme ou com linhas negras longitudinais, acrescida de um colar nugal branco ou amarelo seguido por um colar cervical preto (FERRAREZZI 1993b). A variabilidade no padrão de coloração intra-específica do corpo é usualmente alta, o que tem resultado em algumas delimitações taxonômicas controversas em alguns de seus grupos, especialmente quanto à classificação genérica dos Elapomorphi. WIEGMANN (1843) descreveu o gênero *Elapomorphus*, o qual, posteriormente, teve espécies acrescentadas erroneamente e que foram realocadas (FERRAREZZI 1993b). COPE (1862) restringiu o conceito do gênero, considerando *Elapomorphus* as espécies com um par de placas prefrontais e um par de internasais distintos, e propondo dois novos gêneros: *Phalotris*, designando o grupo que apresenta uma placa prefrontal

única; e *Apostolepis*, para espécies com duas placas prefrontais fundidas às internasais (Figura 1). STRAUCH (1885) fez uma revisão e continuou usando *Elapomorphus*, mantendo a subdivisão de COPE (1862) como três grupos de espécies dentro desse gênero. BOULENGER (1896) sinonimizou *Phalotris* como *Elapomorphus*, mas revalidou *Apostolepis*. LEMA (1984) subdividiu *Elapomorphus* nos subgêneros *Elapomorphus (Elapomorphus)* e *Elapomorphus (Phalotris)*, sendo o último elevado a gênero por FERRAREZZI (1993b), apontando que, além de ser um grupo monofilético, *Phalotris* seria mais relacionado com *Apostolepis*, com quem compartilharia caracteres derivados, do que com *Elapomorphus*, cujas semelhanças corresponderiam a caracteres ancestrais. Mais recentemente, alguns estudos, utilizando marcadores moleculares foram publicados, incluindo espécies de Elapomorhini, porém a amostragem taxonômica sempre foi restrita. ZAHER *et al.* (2009) fizeram uma revisão, com ênfase nos Xenodontíneos, baseada em marcadores moleculares, na qual *Elapomorphus* (uma espécie) e *Apostolepis* (duas espécies) aparecem mais relacionados, ficando as espécies de *Phalotris* (duas espécies) como grupo irmão destes. VIDAL *et al.* (2010), em uma revisão da família Dipsadidae, baseada também em marcadores moleculares, concorda com os dados obtidos por ZAHER *et al.* (2009) para as mesmas espécies, no que diz respeito à relação entre os táxons, entretanto *Phalotris* não aparece como um gênero monofilético. PYRON *et al.* (2011), em uma análise de todos os Colubroidea, incluem duas espécies do grupo, *Phalotris nasutus* e *Apostolepis flavotorquata*, obtendo um agrupamento com Elapomorhini monofilético.

Assim como tem havido grande dificuldade na resolução da sistemática dos gêneros acima citados, a taxonomia das serpentes do gênero *Phalotris* também é alvo de constantes rearranjos nomenclaturais ao longo dos anos. Nesse contexto, os táxons relacionados à *Phalotris lemniscatus* tem um histórico taxonômico complexo. Por apresentarem uma grande variabilidade morfológica, elas vêm sendo descritas como novas espécies ou re-categorizadas, tendo sua posição taxonômica elevada ou rebaixada, a cada novo trabalho (LEMA 1970).

BOULENGER (1896) diferenciou as espécies que considerou como sendo válidas (*Elapomorphus bilineatus* DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854; *Elapomorphus lemniscatus* DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854; *Elapomorphus trilineatus* BOULENGER, 1889). Entretanto, AMARAL (1929) sinonimizou essas espécies como *Elapomorphus bilineatus*.

LEMA (1970) estabeleceu três subespécies *Elapomorphus bilineatus bilineatus*, *Elapomorphus bilineatus reticulatus* (PETERS, 1860), *Elapomorphus bilineatus lemniscatus*. Mais uma vez LEMA (1979) sinonimizou *Elapomorphus bilineatus* a *Elapomorphus lemniscatus*, propondo quatro subespécies: *Elapomorphus lemniscatus lemniscatus*, *Elapomorphus lemniscatus reticulatus*, *Elapomorphus lemniscatus spegazzinii* (BOULENGER) e *Elapomorphus lemniscatus suspectus* (AMARAL).

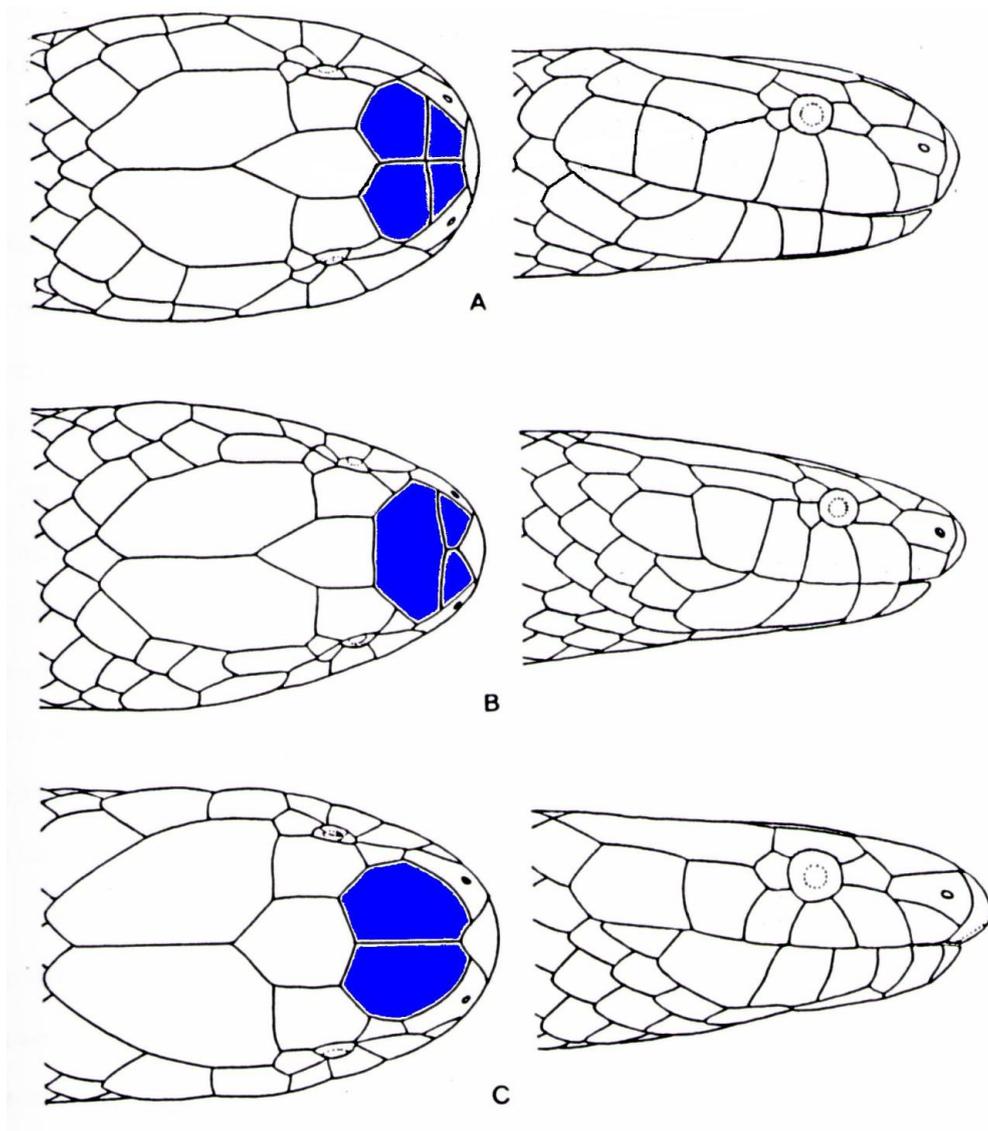


FIGURA 1 - Morfologia externa e escutelação cefálica (vista dorsal e lateral) de *Elapomorphus* (A); *Phalotris* (B) e *Apostolepis* (C). Com detalhe na variação das placas prefrontais e internasais (Ilustração adaptada de FERRAREZZI, 1993b).

Novamente, LEMA (1984), quando separou o gênero *Elapomorphus* em dois subgêneros, descreveu uma nova subespécie para o grupo e sinonimizou *Elapomorphus reticulatus* em *Elapomorphus iheringii* STRAUCH, 1885, ficando o gênero composto por: *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus lemniscatus*, *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus trilineatus*, *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus iheringii* e *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus divittatus*, sendo a última a nova subespécie proposta. Entretanto a sinonimização de *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus reticulatus* em *Elapomorphus (Phalotris) lemniscatus iheringii* não foi aceita e, após a revalidação de *Phalotris* à categoria de gênero, *Phalotris*

lemniscatus e *Phalotris reticulatus* foram reconhecidas como espécies independentes (PUORTO & FERRAREZZI 1993; FERRAREZZI 1993b).

Atualmente, são aceitos os quatro táxons a seguir: *Phalotris reticulatus*, *Phalotris lemniscatus lemniscatus*, *Phalotris lemniscatus trilineatus* e *Phalotris lemniscatus divittatus* (Figura 2). A distribuição desses táxons se dá do sudeste do Brasil, desde São Paulo, ao Uruguai, pelo Planalto Meridional Brasileiro até o Pampa, ocupando uma região de clima temperado com alguma influência subtropical, explicando por que LEMA (2006) se referiu à espécie como própria dos Pampas brasileiro-uruguaios.



FIGURA 2 - Exemplos representativos dos táxons *Phalotris lemniscatus lemniscatus* (A), foto de Guilherme Adams; *Phalotris lemniscatus trilineatus* (B), foto de Diego Alvares; *Phalotris reticulatus* (C) e *Phalotris lemniscatus divittatus* (D), ambas fotos de Márcio Borges Martins.

Com relação à distribuição de cada táxon (Figura 3), *Phalotris reticulatus* possui distribuição própria do Planalto Meridional do Brasil, principalmente na porção oriental, de São Paulo ao Rio Grande do Sul, até Misiones na Argentina. A localidade-tipo é Mundo Novo, Taquara, RS, BR (LEMA 1984). É o único próprio de florestas, sendo encontrado nas florestas úmidas de araucária ou das que lhe substituíram nas partes mais altas do Brasil Meridional (LEMA 1984). *Phalotris lemniscatus lemniscatus* ocorre do Pampa Uruguaio ao Rio Grande do Sul, com alguns registros para as encostas do Planalto Meridional Brasileiro e nordeste da Argentina (Entre Ríos) (LEMA 1994). Ocorre em áreas de campo, de clima temperado. A

localidade-tipo é Montevidéu, no Uruguai (LEMA 1984). *Phalotris lemniscatus trilineatus* tem como localidade-tipo a região do rio Camaquã, São Lourenço do Sul, RS, BR (LEMA 1984). É restrita ao litoral arenoso e baixo do Brasil Meridional até Maldonado, Uruguai, e apresenta alguns registros para o oeste, no Planalto Meridional do Brasil. (LEMA 1994). *Phalotris lemniscatus divittatus* tem como localidade-tipo Passo do Atalho, Canguçu, RS, BR. É endêmica da Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul, estendendo-se até Montevidéu, no Uruguai (LEMA1984). Os registros mais ao norte se situam na encosta do Planalto Meridional do Brasil (LEMA 1994), sendo própria de campos altos cobertos, em parte, por capões de mato, em áreas de clima temperado (LEMA 1984).

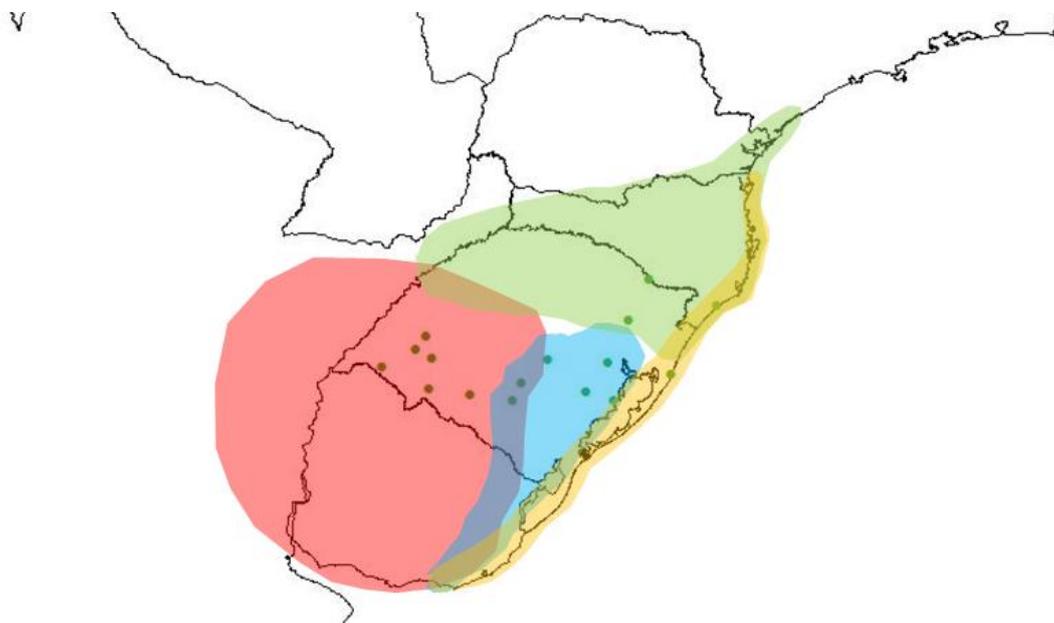


FIGURA 3 - Distribuição aproximada de *Phalotris reticulatus* (verde), de *Phalotris lemniscatus lemniscatus* (vermelho), de *Phalotris lemniscatus trilineatus* (amarelo) e de *Phalotris lemniscatus divittatus* (azul), com os pontos amostrados apontados no mapa (Baseado em LEMA 1984 e em LEMA 1994).

No que diz respeito ao padrão de coloração, percebe-se quatro padrões bastante distintos, estruturados geograficamente, e que têm sido empregados no reconhecimento desses táxons (LEMA 1984, 1994). *Phalotris reticulatus* (Figura 4-C) apresenta cabeça preta, colares nucais evidentes e largos, zona vertebral vermelho-cinábria, zona ventral e pleural pretas, podendo haver pontos esparsos na linha vertebral, representando vestígios da estria vertebral. *Phalotris lemniscatus lemniscatus* (Figura 4-A) possui cabeça castanho-anegrada, colar nucais branco-amarelado e colar preto sempre presentes e bem evidentes, a região dorsal é vermelha, com três estrias longitudinais pretas e largas, lados com estrias creme, e ventre branco com manchas de aspecto semilunar pretas. *Phalotris lemniscatus trilineatus* (Figura 4-B) apresenta

coloração geral clara, com região vertebral pardo-clara, levemente rosada, por vezes de tom cobre, sobre a qual ocorrem três estrias longitudinais pretas, geralmente pretas, mas que se alargam nos adultos, os lados possuem estrias pardo-amareladas, ficando quase brancos na face ventral, onde apresenta manchas pequenas e semilunares. A cabeça é marmorizada de preto com fundo pardo, mais escura nos juvenis e cinzenta nos adultos, com colares nucais ausentes ou vestigiais. Por fim, *Phalotris lemniscatus divittatus* (Figura4-D) apresenta cabeça preta com os colares nucais evidentes, sendo o preto um pouco mais estreito, a zona vertebral é de coloração coral, com as margens delimitadas por estrias longitudinais pretas e largas, os lados são amarelados e o ventre, com semilunares pretas.

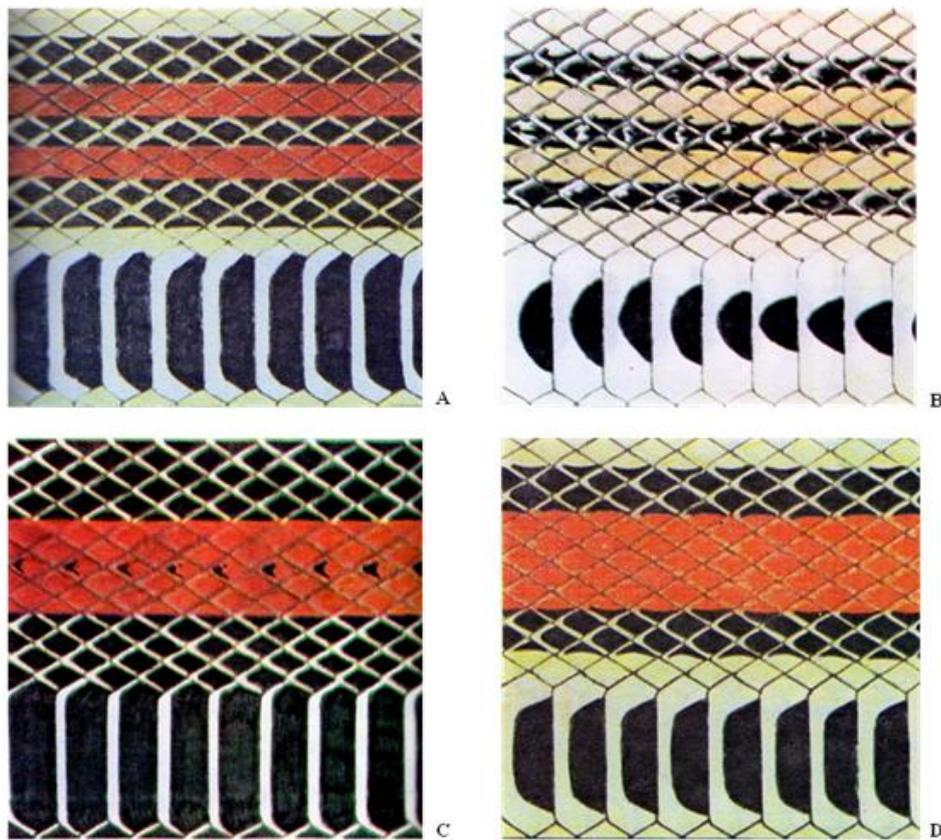


FIGURA 4 - Desenhos esquemáticos do padrão de coloração dorso-ventral de *Phalotris lemniscatus lemniscatus* (A), *Phalotris lemniscatus trilineatus* (B), *Phalotris reticulatus* (C) e *Phalotris lemniscatus divittatus* (D) (Ilustração adaptada de LEMA 1984).

Ferrarezzi (1993b) sugeriu que a espécie *Phalotris lemniscatus*, como reconhecida por Lema (1984), não é um táxon monofilético. Algumas das subespécies parecem ser mais proximamente relacionadas à *Phalotris bilineatus*, o que o levou a elevar *Phalotris reticulatus* ao nível específico. Outro problema ainda carente de revisão é a própria identidade taxonômica dos nomes reconhecidos por Lema (1984). A grande variação morfológica observada impede o

reconhecimento inequívoco de muitos indivíduos, sugerindo problemas na diagnose de todos os táxons atualmente reconhecidos no grupo.

Visto que não há qualquer trabalho publicado acerca desses táxons envolvendo ferramentas moleculares, e que o estudo de táxons mais elevados, baseado nesses caracteres, tem ajudado a lançar uma nova visão acerca dessas relações, o objetivo deste estudo é fazer uma análise das relações filogenéticas existentes entre os táxons relacionados a *Phalotris lemniscatus* e a *Phalotris reticulatus*, visando fornecer informações que auxiliem no entendimento da sistemática desse grupo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM DOS TÁXONS E DOS GENES

Para este estudo, foram utilizadas amostras de tecidos (fígado ou músculo), preservadas em álcool 90%, de 29 indivíduos depositados nas coleções científicas do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCT-PUCRS) (Tabela 1). Dadas algumas incertezas no reconhecimento de alguns dos táxons do grupo, foram incluídas amostras para cada táxon, de diferentes regiões geográficas, sempre que possível. As amostras referentes aos grupos externos foram retiradas do banco de dados do NCBI Genbank, entretanto, não se conseguiu amostras de algumas das espécies escolhidas para alguns genes (Tabela 2). A identificação das subespécies foi feita segundo o trabalho que está sendo desenvolvido acerca da taxonomia do grupo de *Phalotris lemniscatus*, com base em caracteres merísticos e morfométricos (Fabiane Noronha, em prep.). Não foi possível obter amostras de indivíduos da subespécie *Phalotris lemniscatus divittatus*, pertencente ao complexo de espécies estudado.

Com relação aos grupos externos, foram incluídos os táxons *Phalotris nasutus*, *Elapomorphus quinquilineatus* e *Apostolepis dimidiata*, pertencentes à tribo Elapomorphini. Para o enraizamento dos cladogramas foi escolhido *Psomophis joberti*, pois, com base nas filogenias de ZAHER *et al.* (2009), de VIDAL *et al.* (2010) e de PYRON *et al.* (2011), pertence a um grupo de divergência antiga dentre os Xenodontinae. Infelizmente, muitas espécies de Elapomorphini são raras, e contam com poucos testemunhos em coleções científicas, especialmente amostras de tecidos. Por esta razão, não foi possível aumentar o número de táxons de Elapomorphini no grupo externo.

TABELA 1 - Indivíduos de Elapomorphini amostrados e seu município e instituição de origem. UFRGS, coleção científica do Laboratório de Herpetologia da UFRGS; MCP, coleção científica do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS.

Identificação	Espécie	Município	Estado	País
UFRGS 4806	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Rosário do Sul	RS	BR
UFRGS 4938	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Alegrete	RS	BR
UFRGS 4965	<i>Phalotris reticulatus</i>	Bom Jesus	RS	BR
UFRGS 5194	<i>Phalotris reticulatus</i>	Bom Jesus	RS	BR
UFRGS 5267	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Santana do Livramento	RS	BR
UFRGS 5351	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Bom Jesus	RS	BR
UFRGS 5363	<i>Phalotris lemniscatus*</i>	Alegrete	RS	BR
UFRGS 5387	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Alegrete	RS	BR
UFRGS 5400	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Manoel Viana	RS	BR
UFRGS 5401	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Manoel Viana	RS	BR
UFRGS 5402	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Manoel Viana	RS	BR
UFRGS 5417	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Manoel Viana	RS	BR
UFRGS 5427	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Rosário do Sul	RS	BR
UFRGS 5529	<i>Phalotris reticulatus</i>	Bom Jesus	RS	BR
UFRGS 5641	<i>Phalotris nasutus</i>	-	MT	BR
UFRGS 5718	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Alegrete	RS	BR
UFRGS 5767	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Dom Pedrito	RS	BR
UFRGS 6026	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Bagé	RS	BR
UFRGS 6058	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Eldorado do Sul	RS	BR
UFRGS 6088	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Quaraí	RS	BR
UFRGS 6092	<i>Phalotris lemniscatus trilineatus</i>	Quintão	RS	BR
UFRGS 6112	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Santana do Livramento	RS	BR
UFRGS 6113	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Santana do Livramento	RS	BR
MCP 6390	<i>Phalotris lemniscatus trilineatus</i>	Lagoa dos Esteves	SC	BR
MCP 6869	<i>Phalotris reticulatus</i>	Caxias do Sul	RS	BR
MCP 11795	<i>Phalotris lemniscatus trilineatus</i>	Arambaré	RS	BR
MCP 11826	<i>Phalotris lemniscatus*</i>	Cachoeira do Sul	RS	BR
MCP 12131	<i>Phalotris lemniscatus*</i>	Dom Feliciano	RS	BR
MCP 16521	<i>Phalotris lemniscatus lemniscatus</i>	Caçapava do Sul	RS	BR

TABELA 2 - Identificação das seqüências retiradas do banco de dados do NCBI Genbank.

Espécie	12S	16S	BDNF	Cyt b
<i>Apostolepis dimidiata</i>	GQ457782.1	GQ457725.1	-	-
<i>Elapomorphus quinquilineatus</i>	GQ457794.1	GQ457735.1	-	-
<i>Phalotris nasutus</i>	GQ457818.1	GQ457757.1	-	GQ895880.1
<i>Psomophis joberti</i>	GQ457829.1	GQ457768.1	-	GQ895887.1

O estudo teve como base dados moleculares referentes aos marcadores mitocondriais Citocromo b (*Cyt b*), 12S RNA ribossomal (12S) e 16S RNA ribossomal (16S), além do marcador nuclear Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF). A amplificação, via Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), para a obtenção de um montante maior do fragmento de interesse, foi feita utilizando-se os *primers* 703Botp (5' TCA AAY ATC TCA ACC TGA TGA AAY TTY GG 3') e MVZ16p (5' GGC AAA TAG GAA GTA TCA YTC TGG YTT 3'), ambos modificados de POOK *et al.* (2000), para a amplificação do gene *Cyt b*; L1091 (5' CAA ACT AGG ATT AGA TAC CCT ACT AT 3'), modificado de KOCHER *et al.* (1989), e H1557 (5' GTA CRC TTA CCW TGT TAC GAC TT 3'), modificado de KNIGHT e MINDELL (1994), para a amplificação do gene 12S; 16S F (5' CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT 3') e 16S R (5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3'), extraídos de MOTT e VIEITES (2009), para a amplificação do marcador 16S; e BDNF_DRV_F1 (5' ACC ATC CTT TTC CTK ACT ATG G 3') e BDNF_DRV_R1 (5' CTA TCT TCC CCT TTT AAT GGT C 3'), extraídos de VIEITES *et al.* (2007), para a amplificação do gene BDNF.

2.2 PROTOCOLOS LABORATORIAIS

Todas as amostras de tecido obtidas sofreram processo de extração, segundo o Protocolo de Extração com Sal (NaCl) (MEDRANO *et al.* 1990). No termociclador, o programa utilizado para a amplificação do marcador *Cyt b* foi de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, para a desnaturação da dupla fita de DNA, seguido de 3 minutos a 54°C, para o anelamento dos *primers* com a fita molde, e terminando com 1 minuto a 72°C, para a polimerização (extensão) da nova molécula de DNA. Para a amplificação dos marcadores 12S e 16S o programa utilizado foi de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, para a desnaturação, seguido de 45 segundos a 53°C, para o anelamento, e de 1 minuto e 30 segundos a 72°C, para a extensão. Por fim, para a amplificação do marcador BDNF, o programa utilizado iniciou-se com 9 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C (*touchdown*: menos 1°C por ciclo) e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, para a desnaturação, 1 minuto a 50°C, para o anelamento, e 1 minuto e 30 segundos, para a extensão.

Todas as etapas de para obtenção dos dados moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Zoologia da UFRGS. Entretanto, a

purificação e o sequenciamento do marcador *Cyt b* foi feita no Laboratório de Genômica da PUCRS e, dos marcadores 12S, 16S e BDNF, pela empresa MACROGEN (Coréia do Sul).

2.3 ALINHAMENTO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As seqüências foram corrigidas manualmente, pela simples observação do cromatograma, por meio do *software* BioEdit (HALL 1999), para posterior alinhamento das seqüências no *software* MAFFT (KATOHO *et al.* 2002), mantendo-se os parâmetros padrão do programa. Utilizou-se o programa MEGA5 (TAMURA *et al.* 2011) para a verificar se o alinhamento permitia uma tradução adequada para proteína, no caso dos genes codificantes (*Cyt b* e BDNF), e o DnaSP (LIBRADO & ROZAS 2009) para obter o número de sítios polimórficos e de sítios informativos em cada marcador. O *software* Mesquite (MADDISON & MADDISON 2010) foi utilizado para concatenar os dados dos quatro marcadores em uma única matriz. As análises filogenéticas realizadas foram a de Parcimônia e a Inferência Bayesiana, utilizando-se, respectivamente, os *softwares* TNT (GOLOBOFF *et al.* 2008) e MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST 2001; RONQUIST & HUELSENBECK 2003). Informações sobre o padrão de coloração dos indivíduos usados como terminais foram apresentadas juntamente com os cladogramas obtidos, visando avaliar a concordância dos resultados com a taxonomia atual.

Na análise de Parcimônia foi feita uma busca heurística pelas árvores ótimas. Utilizou-se a opção *Traditional Search*, com 100 RAS (Random Addition Sequences) por um máximo de 10 árvores por repetição, seguido pela troca de ramos utilizando-se o algoritmo *Tree Bisection Reconnection* (TBR). Os Índices de Consistência e de Retenção foram calculados para cada árvore ótima, e o Suporte de Bremer foi calculado retendo árvores subótimas com até 20 passos adicionais.

A análise Bayesiana foi feita com 5.000.000 gerações, em quatro cadeias, retendo as árvores a cada 1000 gerações, utilizando os Modelos de Evolução HKY+G para o 12S e o *Cyt b*, GTR+G para o 16S e K80 para o BDNF, os quais foram inferidos segundo o critério AIC, utilizando-se o *software* JModelTest (GUINDON & GASCUEL 2003). O programa Tracer (RAMBAUT & DRUMMOND 2007) foi utilizado para verificar a estabilidade da análise e para calcular o *burn in*.

3. RESULTADOS

3.1 SEQÜÊNCIAS

O alinhamento das seqüências do marcador 12S resultou em 425 sítios, sendo 64 sítios polimórficos. Para o gene 16S foram obtidos 500 sítios, com 37 sítios polimórficos. Com o alinhamento das seqüências do *Cyt b*, 584 sítios foram obtidos, sendo 132 polimórficos. E, por

fim, para o marcador BDNF o alinhamento resultou em 637 sítios, destes, somente 6 eram polimórficos.

3.2 ANÁLISE DE PARCIMÔNIA

Obtiveram-se duas árvores igualmente parcimoniosas, com Índice de Consistência igual a 0,792 e de Índice de Retenção igual 0,843. A árvore resultante do consenso estrito apresentou 463 passos, e, sobre ela, o Suporte de Bremer foi calculado (Figura 5).

3.3 INFERÊNCIA BAYESIANA

Após a estabilização da cadeia, o *burn in* calculado foi de 10%, o que corresponde a descartar as 500 primeiras árvores retidas, utilizando-se somente as restantes para a simulação da distribuição *a posteriori*. A árvore obtida apresenta politomias em vários ramos (Figura 6), sendo que o tamanho dos ramos diz respeito ao tempo de divergência dos clados encontrados.

4. DISCUSSÃO

Todos os terminais do grupo interno formaram um agrupamento monofilético com valor elevado de suporte. Na árvore obtida pelo método de parcimônia o gênero *Phalotris* ficou parafilético, contudo, o ramo que une *Phalotris nasutus* a *Elapomorphus quiquilineatus* apresenta um valor de Suporte de Bremer muito baixo. A adequação dos agrupamentos genéricos, dentro de Elapomorphini nunca foi testada usando marcadores moleculares e apenas a hipótese de FERRAREZZI (1993b), obtida com dados morfológicos, apresenta abrangência taxonômica adequada e sustenta o arranjo reconhecido atualmente. Contudo, a relação entre os gêneros proposta por FERRAREZZI (1993b) não tem sido recuperada em todos os estudos com marcadores moleculares (ZAHER *et al.* 2009; VIDAL *et al.* 2010; PYRON *et al.* 2011). A baixa amostragem taxonômica, porém, ainda impede que considerações mais robustas sejam feitas, uma vez que usualmente apenas uma ou duas espécies de cada gênero foram incluídas nas análises moleculares.

O relacionamento filogenético entre os clados recuperados dentro do grupo interno foi pouco suportado e nenhum dos quatro táxons identificados *a priori* foram recuperados como monofiléticos. Desta maneira, os resultados não permitiram obter uma hipótese consistente do relacionamento entre os táxons do grupo interno. Contudo, os resultados indicam problemas na taxonomia atualmente vigente, corroborando com estudos morfológicos existentes (LEMA 1984) e em andamento (Fabiane Noronha, em prep.).

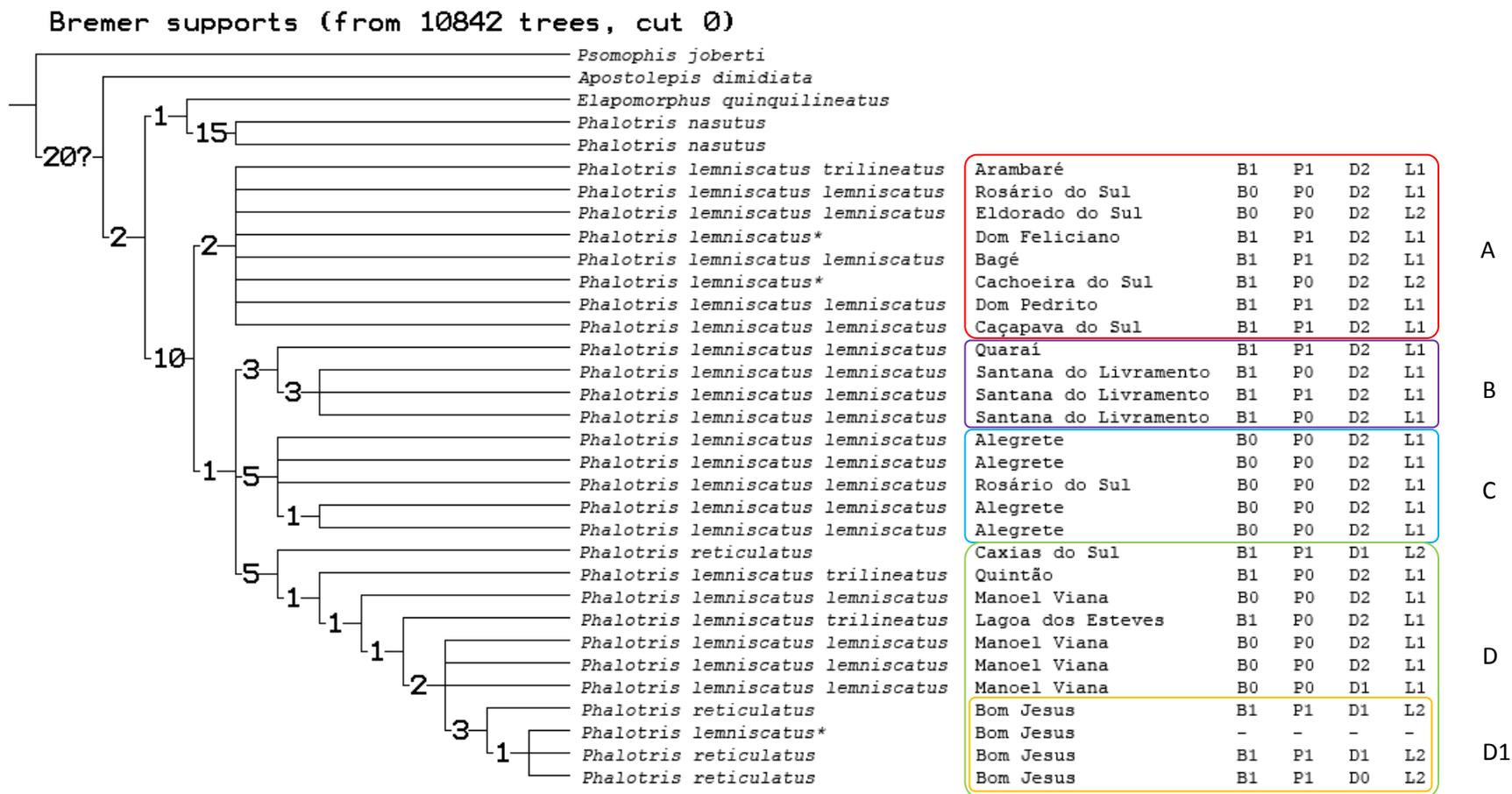


FIGURA 5 - Árvore de consenso estrito entre as duas árvores de Máxima Parcimônia obtidas com a análise concatenada de 2146 pb dos marcadores 12S, 16S, BDNF e Cyt b (CI= 0,792 e RI=0,843). Os valores dos ramos correspondem ao Suporte de Bremer. As letras B, P e D se referem, respectivamente, ao colar nucal branco, ao colar nucal preto e à linha dorsal, com os números correspondendo a ausente (0), vestigial (1) e presente (2). L se refere às linhas laterais, podendo ser estreita (1) ou larga (2). As letras à direita (A, B, C, D e D1) correspondem aos clados recuperados ao se associar a coloração e a localidade dos indivíduos com a topologia da árvore. * Indivíduos com identificação incerta.

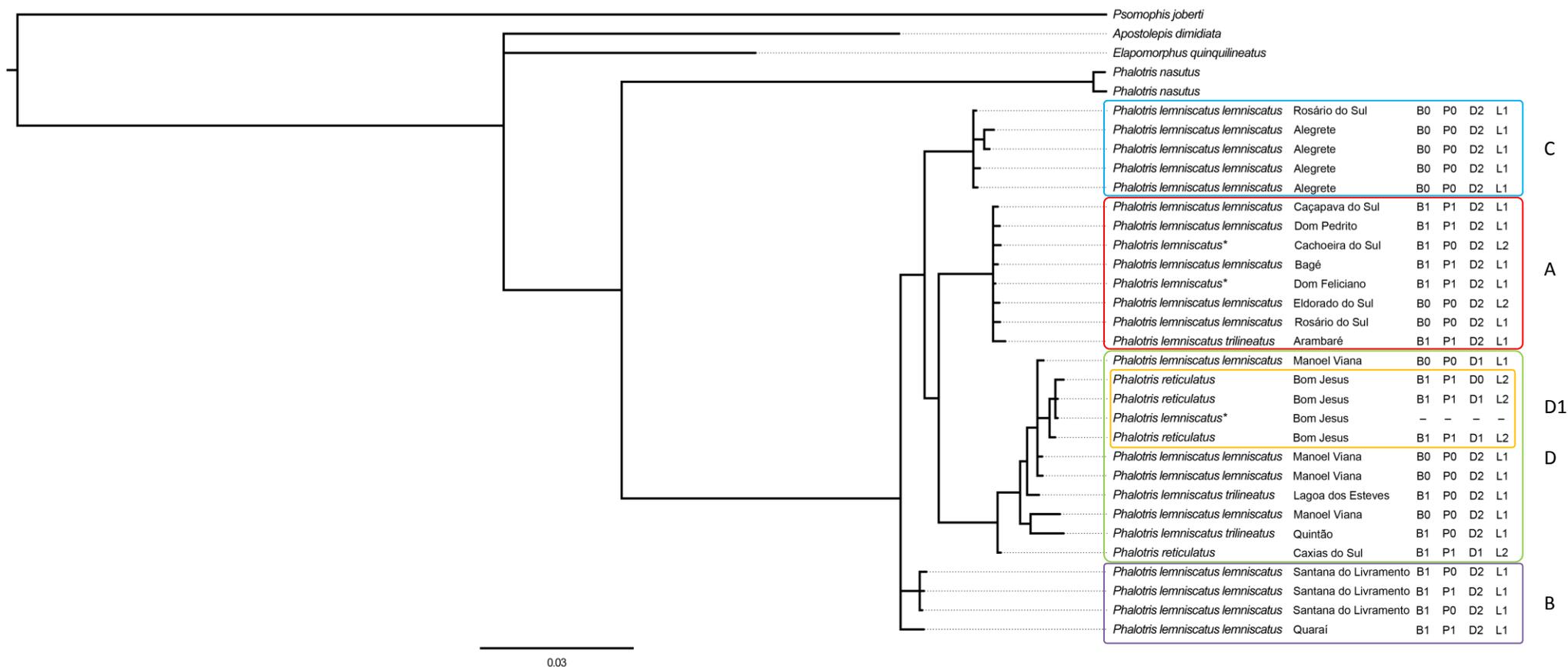


FIGURA 6 - Árvore obtida por meio da Inferência Bayesiana. As letras B, P e D se referem, respectivamente, ao colar nugal branco, ao colar nugal preto e à linha dorsal, com os números correspondendo a ausente (0), vestigial (1) e presente (2). L se refere às linhas laterais, podendo ser estreita (1) ou larga (2). As letras à direita (C, A, D1, D e B) correspondem aos clados recuperados ao se associar a coloração e a localidade dos indivíduos com a topologia da árvore. * Indivíduos com identificação incerta.

Ao se relacionar a coloração dos indivíduos, sua localidade e sua posição na árvore, é possível verificar a existência de quatro clados mais inclusivos, correspondendo, na Figura 5, às letras A, B, C e D, verificando-se, dentro do último, um grupo mais homogêneo, aqui tratado como D1. No que diz respeito à relação dos clados, o grupo A foi recuperado como grupo irmão dos demais táxons, alocados em uma politomia. Todos esses agrupamentos apresentam um suporte muito baixo.

O Clado A abriga todos os indivíduos oriundos de várias localidades associadas ao Escudo Sul-riograndense, porém também inclui um indivíduo de Rosário do Sul (todos esses com morfologia atribuível a *Phalotris lemniscatus lemniscatus*) e um de Arambaré, na Planície costeira, com morfologia atribuível a *Phalotris lemniscatus trilineatus*.

O Clado B abriga três indivíduos de Santana do Livramento e um de Quaraí, os quais corresponderiam a *Phalotris lemniscatus lemniscatus*, que, segundo a descrição de LEMA (1984), anteriormente citada, apresentaria os colares nucais bem evidentes e três estrias longitudinais pretas e largas, sendo própria do Pampa Uruguaio. Entretanto, há indivíduos que, devido à sua coloração e localidade, deveriam estar presentes neste clado para que a hipótese de táxon monofilético fosse sustentada, mas que ficaram alocados em outros grupos, tais como os espécimes de *Phalotris lemniscatus lemniscatus* de Dom Pedrito, de Bagé e de Caçapava do Sul, presentes no grupo A. Além de estar presente neste grupo dois exemplares de Santana do Livramento que não apresentam o colar nugal preto.

Com relação ao Clado C, este inclui indivíduos morfologicamente semelhantes, com características diagnósticas de *Phalotris lemniscatus lemniscatus*, apresentando as três estrias longitudinais bem marcadas, porém sem os colares nucais brancos e pretos. Contudo, outros indivíduos morfologicamente semelhantes estão alocados em outros clados, tais como três dos quatro espécimes de *Phalotris lemniscatus lemniscatus* oriundos de Manoel Viana, agrupados no ramo D, e os de Rosário do Sul e de Eldorado do Sul, agrupados no ramo A.

O Clado D também agrupa indivíduos com padrão de coloração distinto, atribuíveis a diferentes táxons, além de indivíduos de regiões geomorfológicas distintas. Aqui foram agrupados indivíduos de *Phalotris lemniscatus lemniscatus*, *Phalotris lemniscatus trilineatus* e todos os exemplares de *Phalotris reticulatus*, com distribuições desde o Pampa, até o Planalto e o litoral Catarinense. O subgrupo D1 foi destacado por ter-se mostrado monofilético, agrupando espécimes de uma mesma localidade (Bom Jesus) e com um padrão de coloração semelhante, o qual corresponderia à *Phalotris reticulatus* (colares nucais bem evidentes, porém com a linha vertebral ausente ou vestigial e as linhas laterais mais largas, com distribuição própria do Planalto Meridional do Brasil).

Relações semelhantes às encontradas na árvore de Parcimônia puderam ser observadas na árvore obtida pela Inferência Bayesiana (Figura 6) e praticamente os mesmos clados foram identificados (A, B, C, D e D1). O resultado também demonstrou a impossibilidade de

reconhecer como monofiléticos os táxons atualmente reconhecidos. Nessa análise pode-se verificar, por meio do tamanho do ramo, a distância entre o grupo interno e os indivíduos de *Phalotris nasutus*, a qual é o dobro do comprimento do ramo que separa o gênero *Phalotris* de *Apostolepis* e de *Elapomorphus*, podendo esta ser a explicação para o fato de o último ter-se alocado juntamente com *Phalotris nasutus* na Análise de Parcimônia.

A maior diferença se deu no Clado B recuperado por parcimônia, mas que manteve os indivíduos de Santana do Livramento, porém excluiu o exemplar de Quaraí, o qual ficou alocado como uma politomia entre os demais exemplares do grupo B e com o ramo que abriga os Clados A, C e D. Os grupos A, C e D agruparam os mesmos indivíduos que a árvore de parcimônia, inclusive o D1. Vale ressaltar que um estudo em andamento (Fabiane Noronha, em prep.) também não tem tido sucesso em obter caracteres morfológicos que sustentem a identificação dos táxons conforme o padrão de coloração observado em cada região. Uma explicação possível para a ausência de uma distinção clara entre os táxons pode estar na existência de indivíduos híbridos, sugeridos por LEMA em diversos trabalhos (Lema 1984, 2002) os quais, segundo ele, teriam sido os responsáveis por boa parte das descrições e categorizações errôneas. Tais indivíduos ditos híbridos seriam, na realidade, intermediários morfológicos, já que LEMA (1984) apontou a existência de regiões onde ocorreriam intergradações das subespécies em contato. Segundo LEMA (1984), *Phalotris lemniscatus lemniscatus* encontra e intergrada com *Phalotris lemniscatus trilineatus* no lado oriental do Rio Grande do Sul e do Uruguai e, para o nordeste da Depressão Central do Rio Grande do Sul, dispersa-se pelas elevações escalariformes que transicionam do Pampa para o Planalto e aí intergrada com *Phalotris reticulatus*, produzindo híbridos de difícil. *Phalotris lemniscatus trilineatus* parece intergradar com as subespécies do Planalto Meridional, tendo sua dispersão continuamente barrada pelo inter cruzamento (LEMA 1984). Na região entre o campo interno e a planície costeira, no RS e no Uruguai, ocorrem híbridos com *Phalotris lemniscatus lemniscatus*, tornando difícil a identificação de exemplares procedentes desta zona (LEMA 2002). Com relação a *Phalotris reticulatus*, nas encostas meridionais do Planalto, no Rio Grande do Sul, encontra e intergrada com *Phalotris lemniscatus lemniscatus*, bem como no limite nordeste do planalto, ainda no Rio Grande do Sul, intergrada com a subespécie litorânea (LEMA 1994).

Sabendo disso podemos inferir que, no caso do grupo A, os indivíduos se encontram distribuídos no Escudo Sul-riograndense, uma zona na qual há grande contato entre as subespécies (Figura 2) e, como elas se inter cruzam, há um fluxo gênico constante entre uma e outra, gerando, por vezes, indivíduos híbridos também visualmente (intermediários morfológicos), como os reconhecidos por LEMA. Os resultados que vem sendo obtidos por Fabiane Noronha também apontam uma grande variação de caracteres morfológicos nessa região.

Observando também a árvore obtida pela Inferência Bayesiana, percebe-se ramos muito curtos dentro do complexo de *Phalotris lemniscatus*, indicando pouco tempo de divergência dentro do grupo interno. Tal fato também corrobora para a hipótese dos “híbridos”, já que há muitos indivíduos com morfologia intermediária, o que indica que ainda podem ocorrer muitas trocas gênicas, impedindo que haja uma estruturação desses grupos. Entretanto, outro ponto a se considerar é que se sabe que alguns marcadores não são monofiléticos para algumas espécies, gerando resultados contraditórios e confundindo as análises. Sendo assim, o resultado obtido neste trabalho pode estar indicando que os marcadores utilizados talvez não sejam suficientemente informativos para esclarecer as relações existentes entre grupos tão recentes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos genes em questão, os dados obtidos não corroboraram com a estruturação e com a nomenclatura tradicional, indicada pelo padrão de coloração dos indivíduos. Os marcadores utilizados apresentaram poucos sítios informativos, sobre o que se podem inferir dois pontos: ou os genes escolhidos não foram adequados para a solução do problema, visto que há casos de linhagens de genes que não são monofiléticas para determinadas espécies; ou realmente se trata de uma linhagem com pouco tempo de divergência, o que ainda pode estar sendo agravado pelo fluxo gênico atual. O fato de os estudos morfológicos também não encontrarem caracteres claros que diferenciem os táxons, corrobora com a credibilidade da segunda hipótese. Os quatro morfotipos reconhecidos na literatura parecem resultado de um processo de diferenciação geográfica muito recente, com trocas gênicas provavelmente ainda existentes, e que ainda não pode ser detectado pelos marcadores genéticos estudados. Assim, os táxons relacionados a *Phalotris lemniscatus*, atualmente tratados como subespécies e até como espécies distintas, deveriam ser sinonimizados à espécie nominal. Em suma, independentemente da resposta, um estudo com um número maior de marcadores moleculares se faz necessário, além da utilização de outras abordagens como filogeografia, para elucidar a composição das populações, e o estudo de microssatélites, que apresentam altas taxas de mutação e recombinação, sendo muito úteis na análise de diferenciações recentes (OLIVEIRA *et al.* 2006). É interessante também incluir *Phalotris bilineatus* em análises futuras devido à possível proximidade filogenética com *Phalotris lemniscatus* (FERRAREZZI 1993b). Além disso, não há nenhum trabalho envolvendo marcadores moleculares que inclua essa relação em suas análises.

6. REFERÊNCIAS

- Amaral, A. (1929) Estudos sobre ophidios neotropicos. xvii: Valor systematico de varias formas de ophidios neotropicos. *Memórias do Instituto Butantan*, 4, 3–68.
- Boulenger, G. A. (1889) Description of a new Snake and two Fishes obtained by Dr. H. von Ihering in Brazil. *Annals and Magazine of Natural History*, 4, 265–267.
- Boulenger, G. A. (1896) Catalogue of the Snakes in the collection of British Museum (Natural History). *British Museum Natural History*, 12, 350–354.
- Cope, E. D. (1862) Notes on *Elapomorphus* and *Coniophanes*. *Proceedings of the Academy of Natural Science Philadelphia*, 13, 524.
- Duméril, A. M. C.; Bibron, G. & Duméril, A. (1854) Erpétologie Générale ou histoire naturelle complete dès reptiles. *Librairie Encyclopédique de Roret*, 7, 780–1536.
- Ferrarezzi, H. (1993a) Nota sobre o gênero *Phalotris* com revisão do grupo *nasutus* e descrição de três novas espécies (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae). *Memórias do Instituto Butantan*, 55 (supl.1), 21–38.
- Ferrarezzi, H. (1993b) Sistemática filogenética de *Elapomorphus*, *Phalotris* e *Apostolepis* (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae). *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biociências, USP, 276 pp.
- Goloboff, P. A.; Farris, J. S. & Nixon, K. C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hofstadler-Deiques, C. & Lema, T. (2005) On the cranial morphology of *Elapomorphus*, *Phalotris* and *Apostolepis* (Serpentes: Colubridae), and its phylogenetic significance. *Zootaxa*, 1042, 1–26.

- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K. & Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 3059–3066.
- Knight, A. & Mindell, D. P. (1994) On the phylogenetic relationships of Colubrinae, Elapidae, and Viperidae and the evolution of front-fanged venom systems in snakes. *Copeia*, 1994 (1), 1–9.
- Kocher, T. D.; Thoma, W. K.; Meyer, A.; Edwards, S. V.; Pääbo, S.; Villablanca, F. X. & Wilson, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6196–6200.
- Lema, T. (1970) Sobre o status de *Elapomorphus bilineatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854, curiosa serpente subterrânea. *Iheringia, Série Zoologia*, 38, 89–117.
- Lema, T. (1979) Sobre a validade dos nomes *Elapomorphus bilineatus* DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854 e *E. lemniscatus* DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854 (Ophidia, Colubridae). *Iheringia, Série Zoologia*, 54, 77–81.
- Lema, T. (1984) Sobre o gênero *Elapomorphus* Wiegmann, 1843 (Serpentes, Colubridae, Elapomorphae). *Iheringia, Série Zoologia*, 64, 53–86.
- Lema, T. (2002) *Os Répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografia – ofidismo*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 264pp.
- Lema, T. (2006) Aspectos Zoogeográficos do Estado do Rio Grande do Sul (Reptilia). *ADPPUCRS*, 7, 7–16.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (2010). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.74 <http://mesquiteproject.org> (acessado em 14 de novembro de 2011).

- Medrano, J.F.; Aasen, E. & Sharrow, L. (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8 (1), 43.
- Mott, T. & Vieites, D. R. (2009). Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 190–200.
- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R. & Vieira, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2), 294–307.
- Peters, W. (1860) Drei neue Schlangen des K. zoologischen Museums aus Amreica und Bemerkungen über die generelle Unterscheidung von anderen bereits bekkannten Arten. *Monatsber. Akad. Wiss. Berlin Berlin*, 518–519.
- Pook, C. E.; Wüster, W. & Thorpe, R. S. (2000) Historical Biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus viridis*), Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Information. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15 (2), 269–282.
- Puerto, G.; Ferrarezzi, H. (1993) Uma nova espécie de *Phalotris* Cope, 1862, com comentários sobre o grupo *bilineatus* (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae). *Memórias do Instituto Butantan*, 55, 39–46.
- Pyron, R. A.; Burbrink, F. T.; Colli, R. C.; Oca A. N. M. de; Vitt, L. J.; Kuczynski, C. A. & Wiens, J. J. (2011) The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58, 329–342.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (acessado em 14 de novembro de 2011).
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Strauch, A. 1884. Bemerkungen ueber die Schlangengattung *Elapomorphus* aus der Familie der Calamariden. *Bulletin Academy Science St. Pétesburg*, 12, 141–211.

- Vidal, N.; Dewynter, M. & Gower, D. J. (2010) Dissecting the major American snake radiation: A molecular phylogeny of the Dipsadidae Bonaparte (Serpentes, Caenophidia). *Comptes Rendus Biologies*, 333, 48–55.
- Vieites, D. R.; Min, M.S.; Wake, D. B. (2007) Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 104 (50), 19903–19907.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Wiegmann, A. F. A. (1843) In: Fitzinger, L. *Systema Reptilium*, fasc.1. Amblyglossae, Vienna, Braunmüller & Seidel, 106p.
- Zaher, H.; Grazziotin, F. G.; Cadle, J. E.; Murphy, R. W.; Moura-Leite, J. C. de & Bonatto, S. L. (2009). Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 49 (11), 115–153.

ANEXO

REGRAS PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITO



ZOOTAXA

ISSN 1175-5326 (Print Edition) & ISSN 1175-5334 (Online Edition)

A mega-journal for zoological taxonomists in the world

<http://www.mapress.com/zootaxa/support/author.html#Submission>

Information for authors

- **Aim and scope**
 - Research article
 - Correspondence
 - Special issues with collected papers (e.g. Festschrift)
- **Preparation of manuscripts**
- **Submission of manuscripts**
- **Review process**
- **Publication**
 - Page charge and colour plates
 - Open access
 - Reprints

Aim and scope

Zootaxa is a peer-reviewed international journal for rapid publication of high quality papers on any aspect of systematic zoology, with a preference for large taxonomic works such as monographs and revisions. *Zootaxa* considers papers on all animal taxa, both living and fossil, and especially encourages descriptions of new taxa. All types of taxonomic papers are considered, including theories and methods of systematics and phylogeny, taxonomic monographs, revisions and reviews, catalogues/checklists, biographies and bibliographies, identification guides, analysis of characters, phylogenetic relationships and zoogeographical patterns of distribution, descriptions of taxa, and nomenclature. Open access publishing option is strongly encouraged for authors with research grants and other funds. For those without grants/funds, all accepted manuscripts will be published but access is secured for subscribers only. All manuscripts will be subjected to peer review before acceptance. *Zootaxa* aims to publish each paper within one month after the acceptance by editors.

Based on length, two categories of papers are considered.

1) Research article

Research articles are significant papers of four or more printed pages reporting original research. Papers between 4 and 59 printed pages are published in multi-paper issues of 60, 64 or 68 pages. Monographs (60 or more pages) are individually issued and bound, with ISBNs.

Zootaxa encourages large comprehensive taxonomic works. There is no upper limit on the length of manuscripts, although authors are advised to break monographs of over 1000 pages into a multi-volume contribution simply because books over 1000 pages are difficult to bind and too heavy to hold.

Very short manuscripts with isolated descriptions of a single species are generally discouraged, especially for taxa with large number of undescribed species. These short manuscripts may be returned to authors without consideration. Short papers on species of economic, environmental or phylogenetic importance may be accepted at the discretion of editors, who will generally encourage and advise authors to add value to the paper by providing more information (e.g. checklist of or key to species of the genus, biological information.....). Short papers of 4 or 5 pages accepted for publication may be shortened for publication in the Correspondence section.

2) Correspondence

High quality and important short manuscripts of normally 1 to 4 pages are considered to fill blank pages in multi-paper issues. *Zootaxa* publishes the following six types of correspondence:

- opinions and views on current issues of interests to systematic zoologists (e.g. *Zootaxa* 1577: 1-2)
- commentary on or additions/corrections to papers previously published in *Zootaxa* (e.g. *Zootaxa* 1494: 67-68)
- obituary in memory of deceased systematic zoologists (e.g. *Zootaxa* 545: 67-68)
- taxonomic/nomenclatural notes of importance
- book reviews meant to introduce readers to new or rare taxonomic monographs (interested authors/publishers must write to subject editors before submitting books for review; editors then prepare the book review or invite colleagues to prepare the review; unsolicited reviews are not published)
- and short papers converted from manuscripts submitted as research articles but are too short to qualify as formal research articles.

These short contributions should have no more than **20 references** and its **total length should not exceed four printed pages (except editorials)**. Neither an abstract nor a list of key words is needed; major headings (Introduction, Material and methods...) should NOT be used, except for new taxon heading and references. A typical correspondence should consist of (1) a short and concise title, (2) author name and address (email address), (3) a series of paragraphs of the main text, and (4) a list of references if any. For correspondence of 3 or 4 pages, the first or last paragraph may be a summary.

Commentaries on published papers are intended for scholarly exchange of different views or interpretations of published data and should not contain personal attack; authors of concerned papers may be invited to reply to comments on their papers.

Special issues

Special issues with collected papers such as a Festschrift (see Zootaxa 1325 and Zootaxa 1599) within the scope of the journal are occasionally published. Guest editors should send the proposal to the chief editor for approval and instructions. Although guest editors for special issues are responsible for organising the peer review of papers collected within these issues, they must follow Zootaxa's style, standard and peer review procedures. If any papers by the guest editors are to be included in the special issue, then these papers must be handled by editors/colleagues other than the editor(s) involved. Special issues must be 60 or more pages. Normally funding is required to offset part of the production cost. Author payment for open access is strongly encouraged. Reprints can be ordered for the entire issue or for individual papers.

Preparation of manuscripts

1) *General*. All papers must be in English. Authors whose native language is not English are encouraged to have their manuscripts read by a native English-speaking colleague before submission. Nomenclature must be in agreement with the International Code of Zoological Nomenclature (4th edition 1999), which came into force on 1 January 2000. Author(s) of species name must be provided when the scientific name of any animal species is first mentioned (the year of publication needs not be given; if you give it, then provide a full reference of this in the reference list). Authors of plant species names need not be given. Metric systems should be used. If possible, use the common font New Times Roman and use as little formatting as possible (use only **bold** and *italics* where necessary and indentions of paragraphs except the first). Special symbols (e.g. male or female sign) should be avoided because they are likely to be altered when files are read on different machines (Mac versus PC with different language systems). You can code them as m# and f#, which can be replaced during page setting. The style of each author is generally respected but they must follow the following general guidelines.

2) The **title** should be concise and informative. The higher taxa containing the taxa dealt with in the paper should be indicated in parentheses: e.g. A taxonomic revision of the genus *Aus* (Order: family).

3) The **name(s) of all authors** of the paper must be given and should be typed in the upper case (e.g. ADAM SMITH, BRIAN SMITH & CAROL SMITH). The address of each author should be given in *italics* each starting a separate line. E-mail address(es) should be provided if available.

4) The **abstract** should be concise and informative. Any new names or new combinations proposed in the paper should be mentioned. Abstracts in other languages may also be included in addition to English abstract. The abstract should be followed by a list of **key words** that are not present in the title. Abstract and key words are not needed in short correspondence.

5) The arrangement of the **main text** varies with different types of papers (a taxonomic revision, an analysis of characters and phylogeny, a catalogue etc.), but should usually start with an **introduction** and end with a list of **references**. References should be cited in the text as Smith (1999), Smith and Smith (2000) or Smith *et al.* (2001) (3 or more authors), or alternatively in a parenthesis (Smith 2000; Smith & Smith 2000; Smith *et al.* 2001). All literature cited in the text must be listed in the references in the following format (see [a sample page here](#) in PDF).

A) **Journal paper:**

Smith, A. (1999) Title of the paper. *Title of the journal in full*, volume number, page range.

B) **Book chapter:**

Smith, A. & Smith, B. (2000) Title of the Chapter. *In*: Smith, A, Smith, B. & Smith, C. (Eds), *Title of Book*. Publisher name and location, pp. x–y.

C) **Book:**

Smith, A., Smith, B. & Smith, C. (2001) *Title of Book*. Publisher name and location, xyz pp.

C) **Internet resources**

Author (2002) *Title of website, database or other resources*, Publisher name and location (if indicated), number of pages (if known). Available from: <http://xxx.xxx.xxx/> (Date of access).

Dissertations resulting from graduate studies and non-serial proceedings of conferences/symposia are to be treated as books and cited as such. Papers not cited must not be listed in the references.

Please note that (1) **journal titles must be written in full (not abbreviated)**; (2) journal titles and volume numbers are followed by a ","; (3) page ranges are connected by "n dash", not

hyphen "-", which is used to connect two words. For websites, it is important to include the last date when you see that site, as it can be moved or deleted from that address in the future.

On the use of dashes: (1) Hyphens are used to link words such as personal names, some prefixes and compound adjectives (the last of which vary depending on the style manual in use). (2) En-dash or en-rule (the length of an 'n') is used to link spans. In the context of our journal that means numerals mainly, most frequently sizes, dates and page numbers (e.g. 1977–1981; figs 5–7) and also geographic or name associations (Murray–Darling River; a Federal–State agreement). (3) Em-dash or em-rule (the length of an 'm') are used far more infrequently, and are used for breaks in the text or subject, often used much as we used parentheses. In contrast to parentheses an em-dash can be used alone; e.g. What could these results mean—that Niel had discovered the meaning of life? En-dashes and em-dashes should not be spaced.

6) Legends of **illustrations** should be listed after the list of references. Small illustrations should be grouped into plates. When preparing illustrations, authors should bear in mind that the journal has a matter size of 25 cm by 17 cm and is printed on A4 paper. For species illustration, line drawings are preferred, although good quality B&W or colour photographs are also acceptable. See a guide [here](#) for detailed information on preparing plates for publication.

7) **Tables**, if any, should be given at the end of the manuscript. Please use the table function in your word processor to build tables so that the cells, rows and columns can remain aligned when font size and width of the table are changed. Please do not use Tab key or space bar to type tables.

8) **Keys** are not easy to typeset. In a typical dichotomous key, each lead of a couplet should be typed simply as a paragraph as in the box below:

1 Seven setae present on tarsus I ; four setae present on tibia I; leg I longer than the body; legs black in color ... Genus A

- Six setae present on tarsus I; three setae present on tibia I; leg I shorter than the body; legs brown in color ... 2

2 Leg II longer than leg I ... Genus B

- Leg II shorter than leg I ... Genus C

Deposition of specimens

Whenever possible, authors are advised to deposit type specimens in national or international public museums or collections. Authors are also advised to request registration numbers of deposited material in advance of the acceptance of papers to avoid unnecessary delay of

publication. Some countries (e.g. Australia) require that primary type specimens be deposited in collections of the country of origin; authors are advised to take this into consideration.

Submission

Please follow the above basic guidelines and check if your manuscript has been prepared according to the style and format of the journal. Authors are encouraged to submit manuscripts by e-mail as attachments to the subject Editors responsible for your taxa or subject areas; manuscripts on small insect orders without subject editors should be submitted to Dr **Ernest Bernard** (ebernard@utk.edu); manuscripts on other invertebrate taxa without subject editors should be submitted to the Chief editor.

Prior to submitting a manuscript and figures to an editor, please check our website if there are two or more editors per subject, and then contact one of these to announce your intention to submit a manuscript for review. Please indicate the size of the manuscript, the number of figures and the format of these files. Your editor can then respond with special instructions, especially for the submission of many image files.

When you submit your manuscript to your editor, it will be more expedient to the review process if you offer the names of three or more potential reviewers with their complete postal and email addresses. It is also important to include the following statements in your cover letter:

1) All authors agree to its submission and the Corresponding author has been authorized by co-authors; 2) This Article has not been published before and is not concurrently being considered for publication elsewhere (including another editor at Zootaxa); 3) This Article does not violate any copyright or other personal proprietary right of any person or entity and it contains no abusive, defamatory, obscene or fraudulent statements, nor any other statements that are unlawful in any way.

Otherwise, your manuscript will not be processed.

For manuscripts with numerous illustrations, which might be saved as separate TIFF or JPG files, for the purpose of review, it will be easier and more efficient for the subject editors and reviewers to have the figures converted into one larger PDF (Portable Document Format) file, instead of requiring the subject editor to save many files, cutting and copying these into a string of messages/files to the reviewers. You should retain the original figures in a higher resolution format for the final production of the accepted paper. For the text, PDF file along with RTF

(Rich Text format) files are preferred. The advantage of submitting a rtf file for the text part of the manuscript is that the reviewers can emend the manuscript electronically. If you can not prepare PDF files, then submit text in RTF and the figures in TIFF (line drawing scanned at 600 dpi and half tone at 300 dpi; please use LZW compression, if you can, to reduce the size of e-files for easy transmission); if halftone TIFF files are too big (exceeding 2 MB), then submit them in jpeg. See [here](#) for detailed information on preparing plates for publication.

Vector files (charts, maps etc) are best submitted as EMF.

If you do not have access to e-mail, you can send three copies of the manuscript by post. Please double space your ms and leave ample margins for printed manuscripts.

Authors of accepted papers will be asked to submit an electronic version of the manuscript so that the publisher needs not to re-key or scan the ms. At this stage, the text part of the ms must be submitted as RTF or MS Word files and figures as TIFF files. Authors please be aware that line drawings must be scanned at 600 or 900 dpi as line art (=1 bit); they must NOT be scanned as 8 bit or full colour images. Please read details [here](#).

In submitting the final version of revised manuscript to editors, authors are asked to provide the following information to all proper typesetting and indexing of the manuscript:

- 1) Corresponding author name and email
- 2) Author last name and running title (<40 characters; to be used in footer)
- 3) Number of plates and cited references
- 4) High taxon name (i.e. taxon section in Zootaxa website) and number of new taxa described in the paper

Authors need to complete and return an [Assignment of Copyright](#) form when paper is accepted for publication. Authors of institutions that do not allow transfer of copyrights to publishers (e.g. government institutions such as USDA, CSIRO) should attach a copyright waiver or similar documents.

Review process

When a manuscript is received by the [Editor](#), he/she will have it reviewed by at least two peers qualified to evaluate the manuscript and he/she normally asks the reviewers to complete the review in one month. However, the reviewing process will normally take longer, depending on the length of the manuscript and reviewer's responses.

Publication

Once the manuscript is accepted by your subject editor, final files, produced according to Zootaxa requirement, will be forwarded by your subject editor to the chief editor, who will then link with author and the printer to ensure that the paper is published without unnecessary delay. Normally the proof will be sent to the author for checking 1 to 3 weeks after the final files are accepted. The paper will usually be published with two weeks (for larger papers it will take longer) once the corrections to the proof are received.

Page charge and colour plates. There is **no page charge** for publishing with *Zootaxa*. Publication of **colour figures/photographs** in online edition is also free of charge (print version in black and white). If colour plates in the print edition are desired, authors will be asked to contribute towards the full cost. Current rates: 300 USD for the first colour page; 200 USD for each additional colour page.

Open access. Zootaxa endorses the open access of taxonomic information and has published more open access taxonomic papers than any other journal. Authors who have funds to publish are strongly encouraged to pay a fee of 20 US\$ per printed page to give free online access of their papers to all readers at this site or their own site. Open access papers are read by more people and are expected to have higher citation rates.

Reprints. Each author will be given a **free e-reprint** (PDF) for personal use (printing a copy for own use or exchange with other researchers, but not for deposition in a library/website/ftp-site for public access).

Printed copies of each paper/monograph in the form of the regular reprint can also be produced by the Publisher for purchase by authors at cost to authors, with a discount based on the number of copies ordered.