

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ULTRA-ESTRUTURA DE ESPERMATOZÓIDE E FILOGENIA DE
SERPENTES (LEPIDOSAURIA, SQUAMATA)**

Leonora Tavares Bastos

TESE DE DOUTORADO

2007

Pesquisa realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, e desenvolvida no Laboratório de Microscopia Eletrônica, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão (Departamento de Biologia Celular), e sob co-orientação do Prof. Dr. Guarino Rinaldi Colli (Departamento de Zoologia), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, com patrocínio financeiro das seguintes Agências financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), e Universidade de Brasília (UnB).

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dra. Sônia Nair Bão por todos esses anos de convivência e amizade e pelo enorme apoio no desenvolvimento dessa tese.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Guarino Rinaldi Colli pelo apoio, dicas, exemplo profissional, e amizade.

As minhas estagiárias Ana Carolina Vaqueiro, Larissa Cunha, e Marcella Santos por todo carinho, dedicação, e apoio no desenvolvimento desse estudo. Agradeço imensamente a vocês por fazerem parte desse estudo, principalmente pelo fato de termos realizado a revisão de todos os estados de caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide de todos os espécimes utilizados nesse estudo com crítica e horas de dedicação.

As agências de fomento CNPq, CAPES, FINATEC, FINEP pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento dessa tese.

A Universidade de Brasília, Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação, Instituto de Ciências Biológicas, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela oportunidade de desenvolver esse estudo.

Ao Prof. Dr. Miguel Marini, a nossa antiga secretária Nara, e a atual Thais pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e aos alunos.

Aos amigos do laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Bruno Arivabene, Bruno Fiorillo, Vitor Hugo, João Victor, Suzi, Shélida, Marcella, Elaine, Ingrid, Cláudia, Débora, Khesller, Júlio, Rafael, Wellington, e aos agregados Cláudio, Viviane, e Isabel. Aos amigos que trabalharam no lab: Diana, Eni, Adrian, Gabriel Costa, Frederico, Ruscaia, Vivian, Saulo, e especilmente a Carolina Luque por todo apoio e carinho.

Aos professores do laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão Dr^a. Cláudia Renata, Dr. Bergmann, e Dr. Renato e aos seus alunos convivência e ajuda, especialmente à Gláucia, Virgínia, Marcelo Padilha, Anabele, Maria, Thatiane, Aline, e Suzane.

A todos os amigos do laboratório de Herpelogia, especilmente à Mariana Zatz, Fernanda, Rafael, Kátia Colli, Davi, Mariana Mira, Ana Hermínia, Ana Paula, Paula Valdujo, Gabriel Horta, Marcela, Laís, Elisa, Rebecca, Daniel Velho, e Santos Balbino.

Aos seguintes professores, que ministraram disciplinas que contribuíram muito para o desenvolvimento dessa tese: Dr^a. Rosana Tidon, Dr. Antonio Sebben, Dr. Reginaldo Constantino, Dr. José Pujol.

Ao Dr. Francisco Franco do Instituto Butantan que disponibilizou a maioria dos espécimes utilizados nessa tese, e por me receber tão bem no Setor de Herpetologia. Ao Valdir José Germano pela enorme ajuda quando estive no Instituto Butantan.

Ao Prof. Dr. Hussam Zaher do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, e ao Dr. Harry Greene pelas preciosas dicas que muito contribuíram para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Dr. David Gower por ceder material alguns espécimes utilizados e por colaborar com esse estudo.

Ao Daniel Mesquita por toda ajuda em todos os momentos que precisei.

Ao Natan Maciel pela ajuda, força, e amizade.
A Lilian Giugliano por todo apoio com os dados moleculares e amizade.
Ao Gustavo Vieira por todos esses anos de convivência, amizade, e apoio.

A Marge Tenório, Rodeluzi Andrade, Laura Campos, Raquel Coelho, Maristela Pereira, Diva, Prof^a. Helena, e Prof. Schaden por todo incentivo.

A minha amiga Sushma pelo amor, carinho, compreensão, força, e leveza.

Aos meus pais, irmãos, amigos, e familiares que por todo apoio e amor.
Ao meu marido Leandro Ambrósio por tudo!

Dedico

Aos meus pais Tereza Marluce e Hermenegildo
e aos meus irmãos Enéias, Breno, Manoel, e Heitor.

Nunca se me ha ocurrido hablar
con animales elegantes:
no tengo curiosidad
por la opinión de las avispas
ni de las yeguas de carrera.
Yo quiero conversar con las serpientes.
Bestiario (Pablo Neruda)

ÍNDICE

I.	RESUMO	I
II.	ABSTRACT	II
III.	INTRODUÇÃO GERAL	1
1.	Considerações gerais sobre Lepidosauria	1
2.	Origem das Serpentes	2
3.	Considerações gerais sobre serpentes	6
4.	Ultra-estrutura de espermatozóide em Lepidosauria	10
5.	Ultra-estrutura de espermatozóide para análises filogenéticas e estudo sobre a evolução de caracteres	15
IV.	OBJETIVOS GERAIS	16
V.	Capítulo 1: ULTRA-ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE EM SCOLECOPHIDIA	17
VI.	Capítulo 2: EVOLUÇÃO DA ULTRA-ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE EM BOÍDEOS	26
VII.	Capítulo 3: ANÁLISE FILOGENÉTICA DE SERPENTES	34
VIII.	CONCLUSÕES FINAIS	95
IX.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
X.	ANEXOS	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação simplificada das serpentes atuais	8
Tabela 2	Lista de caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide e seus estados	64
Tabela 3	Matriz dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide e respectivos estados nas serpentes e grupos externos, e suas respectivas fontes	66
Tabela 4	Medidas da peça intermediária em serpentes e lagartos	90

LISTA DE FIGURAS

- Capítulo 3 Análise filogenética de Serpentes
- Figura 1 Diagrama do espermatozóide de *Bothrops jararaca*.
- Figura 2 Micrografias eletrônicas de transmissão da cabeça do espermatozóide de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*
- Figura 3 Micrografias eletrônicas de transmissão da região do pescoço e peça intermediária do espermatozóide de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*
- Figura 4 Micrografias eletrônicas de transmissão da peça intermediária, peça principal, e peça final de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*
- Figura 5 Diagrama dos caracteres polimórficos no espermatozóide de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*
- Figura 6 A. Árvore de consenso da maioria obtida na análise morfológica.
B. Árvore de “bootstrap”
- Figura 7 A. Árvore de consenso da maioria obtida na análise molecular.
B. Árvore de “bootstrap”
- Figura 8 A. Árvore de consenso da maioria obtida na análise combinada.
B. Árvore de “bootstrap”

I. RESUMO

A filogenia de serpentes tem sido inferida a partir de dados morfológicos e moleculares, entretanto, não há consenso entre as relações filogenéticas de serpentes. Recentemente a ultra-estrutura de espermatozóide tem sido utilizada para as reconstruções filogenéticas, por conter significativa informação filogenética. Além da análise filogenética, o mapeamento de caracteres permite inferir o curso da evolução de caracteres. A evolução da ultra-estrutura de espermatozóide na família Boidae foi investigada, sendo encontradas novas sinapomorfias (Serpentes, Pythonidae + Boidae, Boidae, *Epicrates cenchria* e *Boa constrictor*). Os resultados indicaram melhor concordância entre a ultra-estrutura de espermatozóide e a filogenia morfológica. Ademais, análises filogenéticas foram realizadas utilizando dados de ultra-estrutura de espermatozóide, osteológicos, e moleculares. As análises corroboraram a divisão basal entre Scolecophidia e Alethinophidia e a hipótese que sugere que o fóssil *Dinilysia patagonica* seja táxon irmão de Alethinophidia. Os dados de ultra-estrutura de espermatozóide contêm informação filogenética e podem fornecer caracteres adicionais para as reconstruções filogenéticas entre as serpentes, entretanto, ainda se faz necessário aumentar a cobertura taxonômica, o número de caracteres, além de estudos sobre espermiogênese. Os resultados sugerem que os dados da ultra-estrutura de espermatozóide são tão bons quanto qualquer outro caráter, devido principalmente ao fato de que revelaram novas sinapomorfias de Serpentes. Enfim, acredito que a integração de biologia comparada, história evolutiva, e combinação de caracteres possam ajudar no esclarecimento das relações de parentesco de serpentes.

II. ABSTRACT

The snake relationships has been inferred from morphological and molecular data sets. However, there is no final conclusion about these relationships. The sperm ultrastructure has being used in phylogenetic analyses for a while, because it contains significant phylogenetic signal. Besides the phylogenetic analyses, mapping of characters permits inferences about the course of character evolution. We investigated the evolution of sperm ultrastructure among boids, and had found novel synapomorphies (Serpentes, Pythonidae + Boidae, Boidae, *Epicrates cenchria e Boa constrictor*). Our results indicate a better agreement between sperm ultrastructure and morphological phylogeny. In addition, we conducted a phylogenetic analyses based on sperm ultrastructural, osteological, and molecular characters. Our analyses corroborated the basal division of Scolecophidia and Alethinophidia, and hypothesis the support which the fossil *Dinilysia patagonica* is sister taxon of Alethinophidia. The sperm ultrastructure data contain phylogenetic information and may provide additional characters to phylogenetic analyses in snakes. However, it is still necessary to increase taxonomic sampling, number of characters, and spermiogenesis studies. Results suggest that sperm ultrastructure data are as good as any other character, due principally to the fact that they revealed novel synapomorphies of snakes. Finally, we conclude that the integration of comparative biology, evolution history, and combined analyses may provide insights into the snakes phylogenetic relationships.

III. INTRODUÇÃO GERAL

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LEPIDOSAURIA

O grupo Lepidosauria é formado pelos Squamata e *Sphenodon* (Rhynchocephalia, Sphenodontidae) (Pianka & Vitt, 2003; Vidal & Hedges, 2005). Estados de caracteres derivados sustentam a hipótese de monofiletismo de Lepidosauria (Saint et al., 1998).

Os Squamata representam um grupo monofilético, grande e bem sucedido de répteis, constituído por lagartos, anfisbênias e serpentes (Pianka & Vitt, 2003; Vidal & Hedges, 2004, 2005; Lee, 2005). As relações filogenéticas dentro de Squamata têm sido discutidas. A filogenia obtida a partir de dados morfológicos por Lee (2005) foi similar à obtida por Estes e colaboradores (1988), porém, foi discrepante com a obtida por dados moleculares (Vidal & Hedges, 2004, 2005; Townsend et al., 2004). Esse grupo é dividido, segundo a hipótese filogenética mais aceita atualmente, em dois grupos, Iguania e Scleroglossa (Estes et al., 1988; Wu et al., 1996; Lee, 2005; Vitt et al., 2003).

O grupo Iguania é dividido em Pleurodonta (Iguanidae) e Acrodonta (Aguamidae e Chamaeleonidae), e o grupo Scleroglossa é dividido em Gekkota e Autarchoglossa (Estes et al., 1988; Pianka & Vitt, 2003; Uetz, 2007).

Os representantes da família Sphenodontidae possuem sistemas óticos bem desenvolvidos, detectando presas móveis. A captura de presas ocorre através da língua; sua mordida é poderosa, mas a abertura da boca é limitada e a velocidade de fechamento é lenta. Uma inovação dentro de Iguania em relação a *Sphenodon* é a streptostilia, ou seja, o osso quadrato está apto a realizar movimentos de rotação, o que permitiu o aumento da abertura da boca e maior velocidade de fechamento (Pianka & Vitt 2003; Vitt et al, 2003). Os representantes do grupo Iguania utilizam detecção visual das presas e as capturam através da língua, tendo a diferença alimentar entre Iguania e Scleroglossa atribuído forte relação entre dieta e evolução nos Squamata (Vitt & Pianka, 2005). Uma inovação dentro de Scleroglossa em relação a Iguania é a mesokinese cranial, ou seja, tanto a mandíbula quanto o maxilar superior possuem mobilidade, o que permitiu uma maior eficácia na apreensão e manipulação de presas ágeis (Vitt et al., 2003; Pianka & Vitt 2003; Vitt & Pianka, 2005). A língua nesse grupo não tem a função de apreensão

de presas, mas é empregada na detecção de sinais químicos, fazendo-os excluir presas tóxicas, que também são detectadas visualmente (Schwenk, 1993a; Pianka & Vitt, 2003; Vitt & Pianka, 2005). Ainda, os Scleroglossa (Gekkota e Autarchoglossa) possuem crânio menos potente e mais flexível do que os Iguania (Schwenk, 2000; Vitt et al, 2003). A aquisição de discriminação química de presas, captura de presas através da mandíbula e forrageamento amplo promoveram vantagem adaptativa em relação aos Iguania (Vitt et al., 2003).

No grupo Gekkota a língua tem a função de umedecimento e limpeza de lábios e olhos, e a distinção de presas é visual e olfatória (olfato nasal), ou seja, moléculas voláteis e pequenas são detectadas a grandes distâncias (Pianka & Vitt, 2003, Vitt & Pianka, 2005).

O grupo Autarchoglossa apresenta o vomerolfato muito desenvolvido. A língua bífida, carrega sinais químicos para a boca, que são transmitidos para o sistema vomeronasal, onde são detectadas moléculas grandes não voláteis. Isso permitiu acesso a presas visualmente não detectáveis, sendo a discriminação de presas visual e vomeronasal (Pianka & Vitt, 2003; Vitt & Pianka, 2005).

2. ORIGEM DAS SERPENTES

A origem das Serpentes é tema muito discutido desde o século 19. Quando Cope (1869) reconheceu o grupo Pythonomorpha (grupo formado pelas serpentes e Mosasauróidea) implicitamente propôs que as serpentes teriam surgido a partir de um ancestral mosassauróide (lagartos aquáticos), implicando na origem marinha das serpentes (McDowell & Bogert, 1954; Lee & Scanlon, 2002). Recentemente, Lee (1998) corroborou o monofiletismo de Pythonomorpha. Na década de 90 as discussões sobre a origem das serpentes e suas inter-relações ganharam um novo ímpeto (Zaher & Rieppel, 1999a), tendo os seguintes fósseis importante papel nessa discussão: *Pachyrhachis problematicus*, *Dinilysia patagonica*, *Najash rionegrina*, *Haasiophis terrasanctus*, *Eupodophis descouensi*, e *Wonambi naracoortensis*.

O fóssil *Pachyrhachis problematicus* (marinho do Cretáceo Médio de Ein Yabrud-

Israel) com membros posteriores bem desenvolvidos, descrito por Haas (1979, 1980) e re-descrito por Caldwell & Lee (1997) tem tido sua posição filogenética bastante discutida, uma vez que combina caracteres primitivos de Squamata e de serpentes macrostomatas (Rieppel & Zaher, 2000a; Zaher & Rieppel, 2002). Várias hipóteses sobre a relação de parentesco de *P. problematicus* e serpentes são propostas. A primeira a surgir foi a de que *P. problematicus* seja a serpente mais basal, grupo irmão de todas as serpentes (Scoleophidia e Alethinophidia). A partir dessa hipótese se insere a perspectiva de que *P. problematicus* seja um intermediário entre mosassauróides e serpentes, tendo as serpentes origem marinha (McDowell & Bogert, 1954; Lee & Scanlon, 2002).

A segunda proposta é a de que *Pachyrhachis problematicus* seja grupo irmão dos Macrostomata (Zaher, 1998; Zaher & Rieppel, 2002; Rieppel & Zaher, 2001a). Esses autores re-analisaram os dados de Caldwell & Lee (1997) e de Lee (1998) e diferentemente deles dividiram as Serpentes em múltiplos táxons terminais, e concluíram que a relação de parentesco entre serpentes e mosassauróides não se sustenta, e que *P. problematicus* possui afinidades macrostomatas, não sendo nem uma serpente basal, nem um intermediário entre serpentes e mosassauróides. Os diferentes resultados, segundo argumentam, deveu-se a Caldwell & Lee (1997) não terem utilizado o fóssil *Dinilysia patagonica* em suas análises, e por Lee (1998) ter tratado Serpentes e *P. problematicus* como um único táxon terminal. Desta forma, as análises realizadas por Lee (1998) não testaram a hipótese de Zaher (1998). E ainda, uma terceira proposta é a de que *P. problematicus* seja considerado um Macrostomata (Alethinophidia), não tendo papel na discussão sobre origem das serpentes (Tchernov et al., 2000; Apesteguía & Zaher, 2006).

O fóssil *Dinilysia patagonica* (terrestre do Cretáceo Superior da Patagonia) também exerce importante papel na discussão sobre a origem das serpentes, pois apresenta características primitivas de Squamata e de Alethinophidia. Esse fóssil tem sua posição filogenética bem discutida. Uma das hipóteses é que seja grupo irmão de todas as serpentes (Scanlon & Lee, 2000), outra, é a de que seria grupo irmão das serpentes do grupo Alethinophidia (Rieppel, 1988b; Tchernov et al., 2000; Apesteguía & Zaher, 2006).

Outro fóssil importante nessa discussão é *Najash rionegrina*, descrita por Apesteguía

& Zaher (2006), uma forma terrestre do Cretáceo Superior da Argentina. Esses autores consideraram *N. rionegrina* a serpente mais primitiva, retendo características morfológicas craniais e vertebrais associadas ao hábito subterrâneo, ou talvez tenha sido uma espécie que tenha vivido na superfície e que ocasionalmente utilizasse túneis produzidos por escavadores.

Todos os outros fósseis marinhos do Cretáceo Médio, tais como *Pachyrhachis problematicus*, *Haasiophis terrasanctus*, *Eupodophis descouensi*, e *Wonambi naracoortensis* são considerados macrostomatas (Rieppel et al., 2002; Apesteguía & Zaher, 2006), não tendo relação especial na origem das serpentes, ao invés disso, representam o primeiro documento inequívoco da incursão das serpentes macrostomatas no mar (Tchernov et al., 2000). A menos que outro fóssil intermediário seja encontrado para relacionar serpentes aos mosassauros, a hipótese de origem terrestre das serpentes é a mais parcimoniosa (Rieppel, 1988b; Greene & Cundall, 2000; Rieppel et al., 2003; Vidal & Hedges, 2004).

Dado a crescente discussão sobre as relações de parentesco de serpentes dentro de Squamata (Rieppel & Zaher, 2000a) e registro fóssil incompleto, a posição filogenética de Serpentes dentro de Squamata é um tema bastante controverso, e que afeta as hipóteses sobre a origem das serpentes (Caldwell, 1999). Na revisão realizada por Rieppel (1988a, b), quatro principais hipóteses de relações de parentesco de Serpentes dentro de Squamata foram propostas: as serpentes são mais fortemente relacionadas aos lagartos varanóides (McDowell & Bogert, 1954); aos lagartos fossoriais (Senn & Northcutt, 1973); às anfisbênias (Rage, 1982); e serpentes e lagartos teriam surgido independentemente de um ancestral comum (Rieppel, 1988b).

De acordo com a hipótese de origem terrestre (Rieppel, 1988b; Greene & Cundall, 2000; Rieppel et al., 2003; Vidal & Hedges, 2004), as serpentes teriam origem a partir de lagartos terrestres (Camp, 1923), ou teriam um ancestral fossorial (Bellairs & Underwood, 1951), sendo mais próximas do clado formado por anfisbênias e dibamídeos ao invés de mais próximas aos mosassauróides (Kluge, 1989; Rieppel & Zaher 2000a).

De acordo com a hipótese de origem marinha, as serpentes seriam o grupo irmão

dos mosassauróides, e compartilhariam um ancestral comum com membros, não fossorial, e aquático (McDowell & Bogert, 1954; Lee, 1998; Lee & Scanlon, 2002). As serpentes seriam mais aparentadas aos lagartos da família Varanidae atuais (Lee & Caldwell, 2000), o que fez ressurgir as hipóteses de Cope (1869) e Nopcsa (1923) (Zaher & Rieppel, 1999a). Lee (1998) realizou duas análises, incluindo ou não os fósseis. Na análise utilizando os fósseis, as serpentes e *Pachyrhachis* seriam grupo irmão dos mosassauróides, e em segundo lugar, dos varanídeos, confirmando a hipótese de origem marinha das serpentes, não existindo possibilidade de origem fossorial (Caldwell, 1999; Lee, 2005). Porém, na análise onde os fósseis foram excluídos, as serpentes seriam grupo irmão do clado formado por Dibamidae e Amphisbaenia (Caldwell, 1999; Lee, 2005). Entretanto, para Lee (1998, 2005) os caracteres que sustentam esse arranjo estão ligados à miniaturização e fossorialidade relacionados com alongamento do corpo, redução de membros, e consolidação do crânio, caracteres relacionados ao ecomorfo fossorial e alongado em serpentes, anfisbênias, e dibamídeos, e desta forma esses táxons agrupar-se-iam devido à convergência por conta dos dados osteológicos, atração dos ramos longos, ou à homoplasia por conta da ausência de fósseis. Por estarem correlacionados, esses caracteres tiveram pesos menores ou foram excluídos das análises (Lee, 1998, 2005). Para Lee (1998, 2005) o ecomorfo fossorial e alongado teria evoluído independentemente nas serpentes, anfisbênias, e dibamídeos. Zaher & Rieppel (2000) concordam com Lee (1998, 2005) que muitos caracteres compartilhados com serpentes, anfisbênias, e dibamídeos possam ser devido à convergência na evolução do ecomorfo fossorial e alongado, resultando da correlação de caráter devido a hábitos escavadores, mas ao invés de demonstrar esta convergência empiricamente, Lee (1998, 2005) aceitou-a como uma premissa, “a priori”, para justificar a arbitrariedade de baixo peso para esses caracteres ou exclusão desses nas análises. Entretanto, a solução para esse problema segundo Zaher & Rieppel (2000) e Rieppel & Zaher (2000a) não seria a de dar menos peso, “a priori”, aos caracteres relacionados com o ecomorfo fossorial e alongado, o que influenciaria as análises filogenéticas, mas sim a busca de evidências empíricas para testar as hipóteses de relações de parentesco.

Outro aspecto em constante discussão é a presença de membros nos fósseis. De acordo com a hipótese terrestre de origem das serpentes, a redução de membros ocorreu na terra. Já para a hipótese de origem marinha, a redução de membros ocorreu na água (Vidal & Hedges, 2004).

Existem algumas explicações para a presença de membros posteriores em *Pachyrhachis problematicus* (Zaher & Rieppel, 1999b): os membros teriam sido perdidos nas serpentes basais e re-adquiridos em *P. problematicus*; os membros poderiam ter sido perdidos independentemente nas serpentes do grupo Scolecophidia, Macrostromata, e várias linhagens de anilióides (Zaher, 1998; Zaher & Rieppel, 1999b; Greene & Cundall, 2000); os membros teriam sido retidos em *P. problematicus*, e perdidos nas serpentes derivadas (Lee, 1998); ou ainda que teria ocorrido perda de membros no ancestral de todas as serpentes, sendo readquiridos no ancestral de *P. problematicus* e *Haasiophis* (Greene & Cundall, 2000). A hipótese de múltiplas perdas de membros em serpentes pode ser considerada possível, embora menos parcimoniosa, pois *Haasiophis* e *P. problematicus* são relacionados aos macrostomatas basais, sendo assim, a conclusão mais parcimoniosa é a de que os membros desenvolveram-se a partir de rudimentos tal como apresentado por *Python* (Cohn & Tickle, 1999), o que comprova que o desenvolvimento de membros a partir de rudimentos nas serpentes basais não é impossível (Zaher & Rieppel, 1999b), ocorrendo uma reversão, presença de membros, em *Haasiophis* e *P. problematicus* (Tchernov et al., 2000). Assim, no futuro, pode-se encontrar mais fósseis de serpentes com membros.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SERPENTES

As serpentes compreendem cerca de 3000 espécies atuais, que variam desde espécies escavadoras diminutas até grandes constritoras, sendo encontradas em todos os continentes exceto na Antártica. Sua diversidade morfológica reflete as diversas adaptações comportamentais, ecológicas, e fisiológicas (Zug et al., 2001; Pough et al., 2003; Uetz, 2007). Algumas características apresentadas pelas serpentes também são encontradas em outros Squamata, como a língua retrátil profundamente bifurcada,

perda do ouvido externo, perda dos arcos temporais, ponta da sínfise mandibular móvel, alongamento do corpo (Estes et al., 1988; Rieppel, 1988b; Coates & Ruta, 2000; Vidal & Hedges, 2004). O monofiletismo de serpentes está bem estabelecido (Heise et al., 1995; Zaher & Rieppel, 1999b; Vidal & Hedges, 2004, Lee & Scanlon, 2002). As sinapomorfias que sustentam seu monofiletismo são: aba descendente ao parietal abrigando o gânglio do trigêmeo e o ramo oftálmico do nervo trigêmeo, arco sistêmico direito muito maior do que o esquerdo (Bellairs & Underwood, 1951); cones funcionais e densamente presentes na retina, corpo ciliar dos olhos sem músculos (Walls, 1940); vesícula biliar posicionada atrás e distante do fígado, com ducto cístico longo (Underwood, 1967); os exoccipitais encontram-se dorsalmente no forame magno (Rieppel, 1988a); linfapófises presentes, clavículas e interclavículas ausentes (Lee, 1997); fêmur vestigial ou ausente, tibia, fíbula, astralagos, e calcâneo ausentes (Caldwell & Lee, 1997; Lee & Caldwell, 1998); lacrimal ausente, contato entre a pré-maxila e maxila não sutural, contato entre o palatino e o vômer móvel (Lee, 1997, 1998; Zaher & Rieppel, 1999b); forame pineal ausente, arco supratemporal incompleto, extremidade do processo vertical do parietal em contato com o parabasisfenóide (Lee, 1998); forame trigêmeo circundado anteriormente pelo parietal, vômer medial ao palatino, palatino com processo medial evidente, ossos pós-dentários (surangular, pré-articular, e articular) fundidos formando um osso composto, membros anteriores ausentes (Lee, 1998; Zaher & Rieppel, 1999b); processo ventrolateral do parietal suturado ao para-basesfenóide, crista circumfenestralis presente, forame mental do dentário único, traços de cintura escapular ausentes, a reposição dentária ocorre por erupção horizontal (Zaher & Rieppel, 1999b); membros posteriores rudimentares (Lee, 1998) ou ausentes (Zaher & Rieppel, 1999b); contato entre a septomaxila e a maxila móvel (Lee & Caldwell, 1998; Lee & Scanlon, 2002); processo anterior do palatino com dentes (Lee & Scanlon, 2002), dentre outras.

As serpentes são divididas em duas linhagens principais: *Scolecophidia* e *Alethinophidia* (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação simplificada das serpentes atuais

Scolecophidia			
	Anomalepididae		
	Typhlopidae		
	Leptotyphlopidae		
Alethinophidia			
	Anilioidea		
		Aniliidae	
		Cylindrophiidae	
		Uropeltidae	
	Macrostomata		
		Basais	
			Boidae
			Pythonidae
			Bolyeriidae
			Tropidophiidae
		Caenophidia	
			Acrochordidae
			Colubroidea
			Viperidae
			Atractaspididae
			Colubridae
			Elapidae

Fontes: Underwood, 1967; Rieppel, 1988b; Cundall et al., 1993; Heise et al., 1995; Tchernov et al., 2000; Cadle, 2001; Lee & Scanlon, 2002; Rieppel et al., 2002; Vidal & Hedges, 2004; Kelly et al., 2003

As serpentes do grupo Scolecophidia são espécies fossoriais com limitada abertura da boca, alimentam-se de pequenas presas, como formigas e cupins (Greene, 1997; Vidal & Hedges, 2004). Esse grupo ocorre em regiões tropicais. Membros da família Typhlopidae são cosmopolitas em regiões tropicais; Leptotyphlopidae distribuem-se nos trópicos e subtropicais da África e Américas, e sudeste da Ásia; enquanto que Anomalepididae

apresenta distribuição disjunta na América Central e América do Sul (Zug et al., 2001). Nos anos anteriores, existiu um desacordo acerca do monofiletismo de Scolecophidia (Bellairs & Underwood, 1951), e mais recentemente um estudo molecular (Heise et al., 1995) também sugeriu seu parafiletismo. Porém, vários estudos tanto morfológicos (Underwood, 1967; Rieppel, 1988b; Cundall et al., 1993; Scanlon & Lee, 2000; Tchernov et al., 2000), quanto moleculares (Vidal & Hedges, 2002a, b; Slowinsk & Lawson, 2002; Wilcox et al., 2002) têm sustentado a hipótese de monofiletismo de Scolecophidia. Esse grupo é composto pelas famílias Anomalepididae, Typhlopidae, e Leptotyphlopidae (Underwood, 1967; Rieppel, 1988b; Heise et al., 1995; Vidal & Hedges, 2002b), que de acordo com Zug et al. (2001) possuem 4, 6, e 2 gêneros, respectivamente.

O grupo Alethinophidia é considerado um grupo monofilético e inclui os grupos Anilioidea e Macrostromata (Tchernov et al., 2000; Zaher & Rieppel, 2002; Slowinski & Lawson, 2002; Vidal & Hedges, 2002a, b; Wilcox et al., 2002). As serpentes do grupo Alethinophidia são mais diversificadas ecologicamente, sendo caracterizadas por mandíbulas altamente móveis e abertura da boca, o que possibilita a aquisição de presas relativamente grandes, principalmente vertebrados (Rieppel, 1988b; Vidal & Hedges, 2004). O monofiletismo de Anilioidea é sustentado por dados morfológicos (Tchernov et al., 2000; Scanlon & Lee, 2000; Apesteguía & Zaher, 2006). Esse grupo é composto pelas famílias Aniliidae, Cylindrophiidae, e Uropeltidae, que de acordo com Zug et al. (2001) possuem 1, 1, e 9 gêneros, respectivamente. Todas as serpentes exceto Scolecophidia e anilióides formam o grupo Macrostromata (Rieppel, 1988b). Esse grupo é dividido em macrostromatas basais e modernos (Greene, 1997). O grupo dos macrostromatas basais é composto por diversas famílias como Boidae, Pythonidae, Bolyeriidae, e Tropidophiidae, contendo 8, 4, 1, e 5 gêneros, respectivamente (Zug et al., 2001). As serpentes do grupo Caenophidia são consideradas macrostromatas modernos. É formado pelas famílias Acrochordidae e pelas serpentes do grupo Colubroidea (Rieppel, 1988b; Lee & Scanlon, 2002; Vidal & Hedges, 2002b; Kelly et al., 2003), formado por quatro famílias (Viperidae, Atractaspididae, Colubridae, e Elapidae) (Greene, 1997). De acordo com Zug et al. (2001) a famílias Acrochordidae, Viperidae, Atractaspididae, Colubridae, e Elapidae possuem 1,

32, 13, 300, e 60 gêneros, respectivamente. O monofiletismo de Macrostromata é sustentado por vários caracteres (Rieppel, 1988b; Zaher, 1998; McDowell, 2001).

Zug et al. (2001) citou que na classificação de Hoffstetter (1962) as serpentes foram divididas em 3 grupos, Scolecophidia (cobras-cegas), Henophidia (serpentes primitivas), e Caenophidia (serpentes modernas). Underwood (1967) corroborou a divisão do grupo Alethinophidia em Henophidia e Caenophidia. Apesar desse termo não ter sido utilizado há muito tempo, Vidal & Hedges (2002a) utilizaram Henophidia para descrever o clado que inclui os boídeos e os anilióides. Apesar de Underwood (1967) não ter realizado uma análise cladística, a era moderna da sistemática de serpentes foi iniciada por sua proposta de classificação de serpentes baseada em várias características, incluindo morfologias externa e interna, histologia, citologia, e bioquímica.

A filogenia de serpentes tem sido inferida utilizando-se dados morfológicos (Rieppel, 1988b; Zaher, 1998; Lee & Scanlon, 2002; Vidal & Hedges, 2004) e moleculares (Cadle, 1988; Heise et al., 1995). Entretanto, sua grande diversidade, registro fóssil em pequena quantidade, incompleto, muitas vezes mal preservado, e a aparente longa história evolutiva têm impedido a resolução das relações filogenéticas de serpentes dentro de Squamata, entre os grandes grupos de serpentes, e entre as famílias de serpentes (Heise et al., 1995; Zaher, 1998; McDowell, 2001; Cadle, 2001; Lee & Scanlon, 2002), por isso as serpentes representam um desafio para a sistemática.

4. ULTRA-ESTRUTURA DE ESPERMATOZÓIDE EM LEPIDOSAURIA

O espermatozóide em Lepidosauria (Healy & Jamieson, 1994; Jamieson, 1995a, b) possui certa constância em sua constituição básica. O espermatozóide em nível ultra-estrutural consiste em região da cabeça, formada pelo complexo acrossomal e o núcleo, peça intermediária e região da cauda, dividida em peça principal e final.

O complexo acrossomal situa-se na porção anterior da cabeça do espermatozóide e é formado, na maioria dos animais, pelo acrossoma e perforatório (Jamieson, 1995a).

O acrossoma é a única organela presente apenas no gameta masculino, facilitando a fusão com as membranas do gameta feminino, e a entrada do espermatozóide no

óvulo (Anderson & Personne, 1973), sendo rica em enzimas, que são liberadas durante a fertilização (Talbot, 1991). É dividido em vesícula acrossomal e cone subacrossomal (Jamieson, 1995a). Seu conteúdo é organizado em compartimentos que têm implicações funcionais durante a fertilização (Talbot, 1991). A vesícula acrossomal pode apresentar-se tanto formada por substância homogênea e elétron-densa (Healy & Jamieson, 1994; Teixeira et al., 1999a), quanto dividida em córtex e medula (Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996). O cone subacrossomal apresenta uma organização paracristalina nos Squamata (Furieri, 1970; Jamieson & Scheltinga, 1993; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996), porém em *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1994) a sua estrutura não é paracristalina. O acrossoma pode apresentar-se circular (Jamieson & Scheltinga, 1994; Oliver et al., 1996) ou achatado (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996).

O perforatório é um bastão localizado no ápice do cone subacrossomal, dentro da vesícula acrossômica, acima do núcleo, em uma posição prenuclear (Jamieson, 1995a). Os Squamata apresentam apenas um perforatório (Jamieson & Scheltinga, 1993; Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), enquanto que em *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1994) ocorre a presença de dois perforatórios dentro dos canais endonucleares. O perforatório, é uma estrutura citoesquelética, provavelmente formada por actina, podendo ter grande capacidade de alongamento, sustentando desta forma, o acrossoma, porém sua função é ainda discutida (Baccetti & Afzelius, 1976), mas é sabido que durante a reação acrossomal e penetração no óvulo em invertebrados, o perforatório exerce papel importante (Baccetti et al., 1980), sofrendo modificações no momento da fertilização (Baccetti & Afzelius, 1976).

Inserida na porção apical do cone subacrossomal, na base do perforatório observa-se uma placa elétron-densa, a placa basal do perforatório (Jamieson & Koehler, 1994), podendo estar ausente (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996). A ponta do perforatório pode apresentar-se afilada (Jamieson & Koehler, 1994; Oliver et al., 1996; Tavares-Bastos et al., 2002; Vieira et al., 2004), arredondada (Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996), ou quadrada (Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996).

O núcleo apresenta material extremamente compactado, resultando em uma forte elétron-densidade, favorecendo a mobilidade do espermatozóide e protegendo-o contra alterações químicas e físicas durante a estocagem e transporte até o local da fertilização (Anderson & Personne, 1973). A região de transição entre a porção anterior afilada e a região cilíndrica é marcada pelos “ombros nucleares”. A região do topo do núcleo geralmente apresenta um canal estreito elétron-lúcido, preenchido por substância elétron-lúcida, a zona epinuclear lúcida (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), que pode estar ausente (Healy & Jamieson, 1994; Oliver et al., 1996). No pólo posterior do núcleo está presente uma depressão, a fossa nuclear (Jamieson, 1995a, b; Oliver, et al., 1996).

A peça intermediária nos Lepidosauria constitui-se de região do pescoço e axonema, sendo delimitada pelo ânulus (Healy & Jamieson, 1994; Jamieson, 1995a, b; Oliver et al., 1996).

A região do pescoço representa a conexão da cabeça ao flagelo do espermatozóide (Jamieson, 1995a, b; Oliver et al., 1996). Constitui-se, nos Lepidosauria, de centríolos proximal e distal, circundados por material pericentriolar, e pelo primeiro anel de corpos densos e/ou mitocôndrias da peça intermediária (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996). Em serpentes o centríolo distal é circundado apenas por colar denso, ou por colar denso e mitocôndrias (Jamieson & Koehler, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996).

O colar denso é uma estrutura elétron-densa que estende-se do núcleo até a primeira mitocôndria (Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996). Foi previamente denominado por Austin (1965) de “neck cylinder”; Hamilton & Fawcett (1968), e Furieri (1970) também utilizaram essa denominação. Austin (1965) já havia notado que a sua presença ocorria apenas em serpentes. O colar denso é formado pelo coalescimento de grânulos densos associados à periferia das mitocôndrias durante a espermiogênese que aglomeram-se ao redor do centríolo distal (Hamilton & Fawcett, 1968). Alguns autores sugeriram que o colar denso seria homólogo aos corpos densos (Austin, 1965; Hamilton & Fawcett, 1968; Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996).

Os centríolos são necessários para a formação do flagelo, sendo o proximal paralelo à base do núcleo, e o distal situado na base do axonema. O par de centríolos está orientado em ângulo reto, assim, um dos centríolos é visibilizado em corte transversal, enquanto que o outro é observado longitudinalmente. O centríolo proximal consiste de nove trincas de microtúbulos, localizando-se entre o núcleo e o centríolo distal (Hamilton & Fawcett, 1968). A estrutura laminar estratificada localiza-se ao redor do centríolo proximal (Oliver et al., 1996), e a estrutura elétron-densa, no centro do centríolo proximal, podendo estar tanto ausente (Jamieson & Koehler, 1994; Oliver et al., 1996; Tavares-Bastos et al., 2002), quanto presente (Oliver et al., 1996; Vieira et al., 2004). O centríolo distal forma o corpo basal do axonema; funciona como o centro organizador de microtúbulos do axonema, e consiste de nove trincas de microtúbulos conectadas a nove fibras protéicas periféricas, ao redor de dois microtúbulos simples centrais do axonema, sendo um deles associado a uma fibra periférica (Jamieson, 1995a). Essas fibras originam o material pericentriolar (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996).

O axonema é composto por nove microtúbulos duplos ligados a nove fibras protéicas periféricas formando um anel ao redor de um par de microtúbulos simples centrais, em um padrão de 9 + 2 (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996). A função das fibras periféricas pode estar relacionada ao movimento vibratório do flagelo (Austin, 1965), ou podem contribuir para movimentos de curvatura (Hamilton & Fawcett, 1968). A bainha fibrosa é formada por anéis regulares e separados, unidos longitudinalmente por uma coluna ventral e outra dorsal, formadas pelas fibras protéicas periféricas densas 3 e 8 (Jamieson, 1995a). Austin (1965) sugeriu que nos répteis essas fibras serviriam como estabilizadoras da bainha fibrosa. Já para Fawcett (1970) a bainha fibrosa teria papel na mobilidade do flagelo. O espessamento das fibras periféricas adjacentes às duplas 3 e 8 ocorre em todos os representantes do grupo Lepidosauria (Healy & Jamieson, 1994; Jamieson, 1995a). Nos Squamata, a bainha fibrosa estendendo-se anteriormente na peça intermediária, porém em *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1994) a bainha fibrosa não estende-se anteriormente na peça intermediária, pois o principal componente axial da peça intermediária no espermatozóide dessa espécie não é a bainha fibrosa e sim o centríolo

distal, que estende-se por todo comprimento da peça intermediária.

Em espermatozoides de Squamata, as mitocôndrias apresentam-se com cristas lineares (Jamieson, 1995a; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996), porém são concêntricas em *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1994).

Como citado anteriormente, grânulos densos coalescem formando o colar denso; os grânulos que não fazem parte da formação do colar denso também coalescem e são carregados para a peça intermediária sendo denominados de corpos densos intermitocondriais (Hamilton & Fawcett, 1968).

Os corpos densos intermitocondriais (extramitocondriais) são restritos aos Squamata, sendo consideradas estruturas de origem mitocondrial (Carcupino et al., 1989), e se intercalam às mitocôndrias, porém sua função permanece desconhecida. Corpos densos intramitocondriais ocorrem em *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1994). Austin (1965) havia denominado os corpos densos de “dense plaques”, e sugeriu que eles coalescem formando o colar denso. Já para Hamilton & Fawcett (1968) os corpos densos não participam da formação do colar denso. Provavelmente os corpos densos intermitocondriais e colar denso compartilham uma origem comum, por sua similaridade na composição (Austin, 1965; Hamilton & Fawcett, 1968; Oliver et al., 1996).

Na maioria dos Tetrapodas o ânulus é um anel denso, presente na junção da peça intermediária e peça principal (Baccetti & Afzelius, 1976). De acordo com Fawcett (1970) sua função é impedir o deslocamento das mitocôndrias para regiões posteriores do flagelo.

A peça principal é a região posterior à peça intermediária. Constitui-se de axonema circundado pela bainha fibrosa, citoplasma e membrana plasmática, apresentando um padrão 9 + 2 microtúbulos, sendo que as nove fibras periféricas estão ausentes ou são vestigiais (Jamieson, 1995a, b).

A peça final é a região posterior ao término da bainha fibrosa; consiste de axonema e membrana plasmática; apresentando comprimento indeterminado. O padrão de microtúbulos do axonema pode apresentar-se organizado ou desorganizado (Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996).

5. ULTRA-ESTRUTURA DE ESPERMATOZÓIDE PARA ANÁLISES FILOGENÉTICAS E ESTUDO SOBRE EVOLUÇÃO DE CARACTERES

A ultra-estrutura de espermatozóide tem sido estudada em diversas famílias de Squamata e tem fornecido uma fonte de caracteres para as análises filogenéticas. Por esse motivo, análises filogenéticas a partir da ultra-estrutura do espermatozóide vem ganhando interesse por fornecer dados alternativos para inferências filogenéticas (Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996; Oliver et al., 1996, Teixeira et al., 1999a,b; Vieira et al., 2005, 2007).

Além da análise filogenética, o mapeamento de caracteres em uma filogenia proposta contribui para o entendimento do uso desse conjunto de caracteres, pois mapear estados de caracteres em uma filogenia possibilita inferir acerca do curso da evolução de caracteres (Pagel, 1999), isto é, identifica similaridade (Brooks & McLennan, 1991; Harvey & Pagel, 1991; McLennan, 1994; Brown et al., 2000) e variabilidade (Schwenk, 1993b; Brown et al., 2000).

IV. OBJETIVOS GERAIS

Esse estudo tem como perspectiva compreender e melhorar essa fonte de caracteres, a ultra-estrutura de espermatozóide, e conseqüentemente contribuir para o aperfeiçoamento da resolução das hipóteses de parentesco entre as famílias de serpentes, e entre as serpentes e os outros grupos de Squamata. Para tanto, os seguintes objetivos foram estabelecidos:

1) Descrever e analisar o estado dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em famílias de serpentes (Anomalepididae, Typhlopidae, Leptotyphlopidae, Aniliidae, Cyliodrophiidae, Boidae, Pythonidae, Tropidophiidae, Acrochordidae, Viperidae, Colubridae, e Elapidae);

2) Comparar os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em espécies representantes das famílias citadas anteriormente com os grupos externos (Sphenodontidae, Iguanidae, Gekkonidae, Pygopodidae, Teiidae, Varanidae e Amphisbaenidae);

3) Comparar os estados dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em espécies representantes das três famílias de Scolecophidia (Anomalepididae, Typhlopidae, e Leptotyphlopidae).

4) Investigar a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide na família Boidae, mapeando os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em filogenias morfológica (Kluge, 1991) e molecular (Austin, 2000).

5) Conduzir análises filogenéticas baseada em conjunto de dados combinados e separados, utilizando os dados de ultra-estrutura de espermatozóide, osteológicos, e dados moleculares (C-mos, 12S e 16S).

V. Capítulo 1

ULTRA-ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE EM SCOLECOPHIDIA

1.1 RESUMO

Vários estudos envolvendo a ultra-estrutura de espermatozóide têm sido realizados em diversas famílias de Squamata, porém o grupo das serpentes tem sido pouco estudado, assim, tornam-se necessários mais estudos ultra-estruturais de espermatozóide não só em serpentes, como também em outros membros de Squamata, por isso a ultra-estrutura de espermatozóide nas seguintes famílias de Scolecophidia foi descrita: Anomalepididae, Typhlopidae, Leptotyphlopidae e comparadas dentro desse grupo. Para tanto, epidídimos obtidos de espécimes machos reprodutivos foram retirados e processados para Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Em nível ultra-estrutural o espermatozóide de Squamata é constituído por região da cabeça (complexo acrossomal e núcleo), peça intermediária e região da cauda (peça principal e final). Verificou-se que o espermatozóide das espécies estudadas apresenta as sinapomorfias de Squamata e de serpentes; também foi observada variabilidade intrafamiliar na família Typhlopidae, o que sugere que o estudo comparativo da ultra-estrutura de espermatozóide promove dados úteis para acessar a reconstrução filogenética de serpentes, assim como de Squamata.

1.2 INTRODUÇÃO

As serpentes do grupo Scolecophidia retêm muitas características ancestrais, associadas à vida subterrânea, e forma um grupo monofilético (Rieppel 1988a; Cundall et al. 1993; Scanlon & Lee 2000; Tchernov et al. 2000; Vidal & Hedges 2002b) com três famílias: Leptotyphlopidae, Typhlopidae, e Anomalepididae (Underwood, 1967; Groombridge, 1979; Rieppel, 1988a; Heise et al., 1995; Vidal & Hedges, 2002b).

Análises prévias de dados moleculares e morfológicos somáticos resultaram em hipóteses discrepantes de relações de parentesco entre Anomalepididae, Leptotyphlopidae, e Typhlopidae. Vidal & Hedges (2002b), utilizando dados moleculares (C-mos, 12S RNAr, 16S RNAr, e citocromo b), indicaram que Leptotyphlopidae é o grupo irmão do clado formado por Anomalepididae e Typhlopidae. Dados morfológicos somáticos corroboraram essa análise (Rieppel, 1988a, Cundall et al., 1993; Scanlon & Lee 2000; Lee & Scanlon, 2002), entretanto, Heise et al. (1995), também utilizando dados moleculares (12S RNAr e 16S RNAr) concluíram que Typhlopidae e Leptotyphlopidae são mais fortemente relacionadas entre si do que com Anomalepididae.

Em serpentes o espermatozóide é constituído em nível ultra-estrutural de região da cabeça (complexo acrossomal e núcleo), peça intermediária e região da cauda (peça principal e final) (Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996). O único estudo sobre a ultra-estrutura de espermatozóide do grupo Scolecophidia foi realizado por Harding et al. (1995) que descreveram o espermatozóide de *Ramphotyphlops* ssp. O espermatozóide da maioria das serpentes é circundado por membranas multilaminares (Hamilton & Fawcett, 1968; Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996) e microtúbulos extracelulares (Austin, 1965; Hamilton & Fawcett, 1968; Furieri, 1970; Jamieson & Koehler, 1994; Oliver et al., 1996) em todas as suas regiões. A origem e função dos microtúbulos extracelulares ainda são desconhecidas (Boisson & Mattei, 1966; Hamilton & Fawcett, 1968). Esses, podem ser vistos no ducto ao redor do espermatozóide, sendo observados tanto em cortes transversais quanto em cortes longitudinais, não estando associados ao espermatozóide (Austin, 1965). Foi sugerido que os microtúbulos extracelulares seriam

um vestígio do processo de espermiogênese, a chamada “manchette”, uma estrutura composta por microtúbulos associados lateralmente ao núcleo, mas notou-se que são externos à membrana plasmática e persistem no espermatozóide (Boisson & Mattei, 1966; Furieri, 1970; Oliver et al., 1996). O papel de ancoramento para os microtúbulos extracelulares foi sugerido em um estudo sobre espermiogênese (Al-Hajj et al., 1987). As membranas multilaminares e os microtúbulos extracelulares são estruturas presentes no desenvolvimento do espermatozóide em Squamata, e a evidência, ainda incerta, da conversão de microtúbulos extracelulares em membranas multilaminares (apêndices laminares semelhantes à membrana) possivelmente representa um estágio na produção de membranas, isso sugere que estas múltiplas camadas de membranas promovam recurso de fosfolipídios endógenos utilizados como fonte de energia para a motilidade (Hamilton & Fawcett, 1968; Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996). Uma evidência a favor dessa hipótese é a redução de membranas multilaminares no espermatozóide de *Boiga irregularis*, que apresenta microtúbulos extracelulares em maior número do que nas outras serpentes (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996).

Em relação à evolução da ultra-estrutura de espermatozóide, fibras 3 e 8 apresentando-se muito espessas no axonema foi considerada uma sinapomorfia de serpentes por Hamilton & Fawcett (1968), e mais recentemente Healy & Jamieson (1994), Harding et al. (1995), Jamieson (1995, 1999) e Oliver et al. (1996), apontaram as sinapomorfias de serpentes: 1) redução ou perda da placa basal do perforatório; 2) redução da região da zona epinuclear lúcida. 3) presença de colar denso; 4) alongamento da peça intermediária; 5) presença de membranas multilaminares; e 6) presença de microtúbulos extracelulares.

1.3 JUSTIFICATIVA

A ultra-estrutura de espermatozóide tem sido estudada em várias famílias de Lepidosauria, como por exemplo, Chamaeleonidae (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), Gekkonidae (Furieri, 1970; Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996), Gymnophthalmidae (Teixeira et al., 1999b; Colli et al., 2007), Lacertidae (Furieri, 1970; Butler & Gabri, 1984; Courtens & Depeiges, 1985; Jamieson, 1995a), Phrynosomatidae (Scheltinga et

al., 2000), Polychrotidae (Clark, 1967; Furieri, 1974; Teixeira et al., 1999c), Pygopodidae (Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996), Scincidae (Furieri, 1970; Okia, 1990; Jamieson & Scheltinga, 1993; 1994; Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996), Teiidae (Newton & Trauth, 1992; Tavares-Bastos et al., 2002; Giugliano et al., 2002; Teixeira et al., 2002; Colli et al., 2007), Tropiduridae (Furieri, 1974; Teixeira et al., 1999d), Amphisbaenidae (Teixeira et al., 1999a), Iguanidae (Vieira et al., 2004), Varanidae (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), e Sphenodontidae (Healy & Jamieson, 1994).

Em relação aos Squamata, o grupo das serpentes tem sido o menos estudado. O espermatozóide foi descrito em poucas espécies das famílias Colubridae (Jamieson & Koehler, 1994; Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), Elapidae (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), Pythonidae (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), e Typhlopidae (Harding et al., 1995). Os trabalhos de Austin (1965) e de Hamilton & Fawcett (1968) relacionados às famílias Boidae, Colubridae, Elapidae contém poucos caracteres que são comumente utilizados para análise filogenética. A descrição do espermatozóide de *Boa constrictor occidentalis* realizada por Tourmente et al. (2006) foi focada em competição de espermatozóide e acasalamento; contendo também poucos caracteres utilizados em análise filogenética. Sendo assim, tornam-se necessários mais estudos ultra-estruturais de espermatozóide nas famílias de serpentes.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Descrever o estado dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide nas famílias de Scolecophidia (Anomalepididae, Typhlopidae, e Leptotyphlopidae);
- 2) Comparar os estados dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em espécies representantes das três famílias de Scolecophidia.

1.5 MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes machos reprodutivos foram coletados, eutanasiados, e fixados em formalina 10%. Os epidídimos foram retirados e fixados para Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Foram utilizados nesse estudo tecidos dos espécimes listados a seguir. Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília: *Typhlops reticulatus* (CHUNB 40659) (Typhlopidae) coletado no Cachimbo, Pará, Brasil (86°S, 55°5'W), *Leptotyphlops koppesi* (CHUNB 40750) (Leptotyphlopidae), coletado em Luziânia, Goiás, Brasil (16°5'S, 48°W). Coleção Herpetológica do Instituto Butantan: *Liotyphlops beui* (IB 43608) (Anomalepididae) coletado na Freguesia, São Paulo, Brasil (23°9'S, 46°7'W).

Para Microscopia de Luz, espermatozóides obtidos do epidídimo de *Typhlops reticulatus* foram fixados em 2 % de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, analisados e fotografados no Microscópio Axiophot Zeiss, equipado com contraste interferencial; para estabelecer medidas de tamanho de espermatozóide, bem como das regiões que o compõe.

Para a ultra-estrutura de espermatozóide, os epidídimos de *Leptotyphlops koppesi* e *Typhlops reticulatus* foram cortados transversalmente em pequenos pedaços (~1mm). O tecido epididimal foi fixado overnight a 4°C em solução contendo 2 % de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, e 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. O material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e pós-fixado a 4°C por 60 minutos em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 5mM de cloreto de cálcio em 0,1M de tampão cacodilato de sódio pH 7,2. A desidratação ocorreu em soluções de concentrações crescentes de acetona (30- 100%), e a inclusão em resina Spurr. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Reichert, utilizando faca de diamante. As secções foram contrastadas em acetato de uranila saturado (3%) e citrato de chumbo (1%); examinadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® 1011 operado a 80KV. O material de *Liotyphlops beui* proveniente da Coleção Herpetológica do Instituto Butantan, foi reidratado em concentrações decrescentes de álcool (70-30%), lavado em água destilada, e posteriormente em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2; as etapas de pós-fixação, desidratação, inclusão em resina Spurr, constrastação e análise seguiu o mesmo protocolo dos espécimes acima citados.

1.6 RESULTADOS

Apresento aqui um resumo sobre o artigo publicado no periódico Acta Zoológica (Stockholm) “Ultrastructure of spermatozoa of scolecophidian snakes (Lepidosauria, Squamata)” (Anexo I).

Ultra-estrutura de espermatozóide

Foi realizada a descrição detalhada da ultra-estrutura de espermatozóide de *Leptotyphlops koppersi* (Leptotyphlopidae), *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae) e *Liotyphlops beui* (Anomalepididae), e comparada dentro de Scolecophidia utilizando dados de *Ramphotyphlops waitii* (Harding et al., 1995). O espermatozóide de todas as espécies apresenta o mesmo padrão geral, sendo filiforme e apresentando três regiões distintas: cabeça, a qual consiste do complexo acrossomal e núcleo, peça intermediária e cauda, diferenciada em peça principal e peça final.

Caracteres polimórficos

Nas quatro espécies de serpentes do grupo Scolecophidia (as três espécies estudadas nesse artigo e *Ramphotyphlops waitii* (Harding et al., 1995) foram encontrados 8 caracteres polimórficos: 1) Presença da placa basal do perforatório em *Typhlops reticulatus*, *Leptotyphlops koppersi*, e *Liotyphlops beui*, e sua ausência em *Ramphotyphlops waitii*; 2) presença do espaço entre a vesícula acrossômica e o perforatório apenas em *R. waitii*; 3) ponta do perforatório afilada em *T. reticulatus*, e arredondada em *L. koppersi* e *R. waitii*; 4) acrossoma achatado, em corte transversal, em *T. reticulatus*, e circular em *L. beui*, *L. koppersi*, e *R. waitii*; 5) presença da protuberância unilateral da superfície acrossômica apenas em *L. beui*; 6) Presença da estrutura elétron-densa no centríolo proximal em *T. reticulatus* e *L. beui*, e sua ausência em *L. koppersi*; 7) ânulos triangular em *T. reticulatus* e *L. beui*, e linear em *L. koppersi*; e 8) mitocôndrias em corte transversal, irregulares em *L. koppersi*, e arredondadas em *T. reticulatus*, *L. beui*, e *R. waitii*, respectivamente.

Sinapomorfias

Os caracteres observados no espermatozóide de *Leptotyphlops koppesi* (Leptotyphlopidae), *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae), *Liotyphlops beui* (Anomalepididae), e *Ramphotyphlops waitii* (Harding et al., 1995) (Typhlopidae) foram reconhecidos previamente por Healy & Jamieson (1994), Harding et al. (1995), Jamieson (1995a, b, 1999) e Oliver et al. (1996) como sinapomorfias de Squamata: único perforatório, totalmente pré-nuclear; ausência de canais endonucleares; mitocôndrias sinuosas com cristas mitocondriais lineares; corpos densos intermitocondriais; bainha fibrosa penetrando anteriormente na peça intermediária; ombros nucleares arredondados; cone subacrossomal paracristalino; axonema formando o principal componente axial da peça intermediária; centríolo distal curto; e ânulos reduzido. A presença da zona epinuclear lúcida, considerada uma sinapomorfia de Squamata (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson 1995, 1999), foi observada em *L. koppesi*, *T. reticulatus*, e *L. beui*, mas não foi confirmada em *R. waitii* (Harding et al., 1995).

Os espermatozóides de *L. koppesi*, *T. reticulatus*, *L. beui*, e *R. waitii* (Harding et al. 1995) apresentam os seguintes caracteres, considerados sinapomorfias de serpentes (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson, 1995a, 1999; Oliver et al., 1996): presença de colar denso, membranas multilaminares e microtúbulos extracelulares; redução da placa basal do perforatório e da zona epinuclear lúcida; e excessivo alongamento da peça intermediária.

1.7 CONCLUSÃO

A posição de Leptotyphlopidae como grupo irmão do clado formado por Anomalepididae e Typhlopidae, sustentado por dados moleculares (Vidal & Hedges, 2002b) e morfológicos (Rieppel, 1988b; Cundall et al., 1993; Scanlon & Lee, 2000; Lee & Scanlon, 2002), é corroborada por dois caracteres da ultra-estrutura de espermatozóide: *T. reticulatus*, *L. beui* e *R. waitii* compartilham entre si, a presença da elétron-densidade central no centríolo proximal e mitocôndrias arredondadas em cortes transversais. Por outro lado, a hipótese de Heise et al. (1995) que considera Typhlopidae como grupo

irmão de Leptotyphlopidae, ao invés de Anomalepididae, é corroborada pela ausência da protuberância na superfície acrossomal em *L. koppesi* e *T. reticulatus*.

Comparações da ultra-estrutura de espermatozóide das duas espécies da família Typhlopidae, *T. reticulatus* e *R. waitii* sugerem a existência de polimorfismo intrafamiliar, que inclui a forma da região mais anterior do complexo acrossômico e a estrutura do perforatório. Giugliano et al. (2002) sugeriram que caracteres polimórficos foram encontrados dentro de algumas famílias de Squamata. A variação observada em *T. reticulatus* e *R. waitii* sugere que o exame de outros membros de Scolecophidia pode fornecer caracteres adicionais no esclarecimento das relações intrafamiliares e determinar quais caracteres são mais proveitosos para as reconstruções filogenéticas. Assim, os caracteres obtidos da ultra-estrutura de espermatozóide nas serpentes do grupo Scolecophidia podem enriquecer a discussão sobre a origem e as relações filogenéticas de serpentes.

VI. Capítulo 2

**EVOLUÇÃO DA ULTRA-ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE EM
BOÍDEOS**

2.1 RESUMO

Mapear caracteres em uma filogenia permite inferir sobre similaridade e variabilidade, a partir da concordância ou não entre o mapeamento de caracteres e a filogenia proposta, porém poucos estudos têm abordado a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide em Squamata. Desta forma, a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide foi investigada em três espécies de bóieos (*Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, e *Corallus hortulanus*). Para tanto, os epidídimos foram dissecados e processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão, e investigada a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide em duas filogenias baseadas em caracteres morfológicos e moleculares, utilizando serpentes, lagartos, e tuatara como grupos externos. Em nível ultra-estrutural os espermatozoides das três espécies de bóieos constituem-se de região da cabeça (núcleo e complexo acrossômico), peça intermediária, e região da cauda (peça principal e final), e apresentam as sinapomorfias de Squamata e de Serpentes. Novas sinapomorfias, comuns às duas filogenias, foram identificadas: de Serpentes (ausência da placa basal do perforatório e arranjo das mitocôndrias em tubos sinuosos em corte oblíquo), de Elapidae + Colubridae (ausência da estrutura eletrôn-densa no centríolo proximal), e de Boidae (ausência de córtex e medula na vesícula acrossômica e presença de fibras 3 e 8 na região mais anterior da peça principal). Os resultados sugerem uma melhor concordância dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide e a filogenia morfológica (Kluge, 1991). Desta forma, esse estudo contribui para um melhor entendimento do uso desses caracteres à medida que investigou a evolução dos caracteres dentro da família Boidae.

2.2 INTRODUÇÃO

Análise comparativa em estudos morfológicos é uma ferramenta útil para investigar homologia e adaptação (Brooks & McLennan, 1991; Harvey & Pagel, 1991; McCracken et al., 1999), mas é importante distinguir qual a força seletiva que é responsável pela origem dos estados dos caracteres, e o que mantém esses estados em populações contemporâneas (Harvey & Pagel, 1991).

O principal agente responsável pela produção de adaptação e diversidade é a seleção natural (Freeman & Herron, 1998), porém, muitos outros fatores influenciam a evolução, podendo as espécies diferir por outras razões, como o acaso e a história filogenética (Futuyma, 2003).

O mapeamento de estados de caracteres em uma filogenia permite inferir sobre o curso da evolução de determinado caráter (Pagel, 1999), podendo ser utilizada para testar hipóteses de similaridade e de variabilidade. Permite assim, a identificação de similaridade devido à herança comum (homologia), ou a eventos evolutivos e independentes (homoplasia) (Brooks & McLennan, 1991; Harvey & Pagel, 1991; McLennan, 1994; Brown et al., 2000). Essa ferramenta também permite a identificação de variabilidade devido a processos evolutivos ao acaso (Schwenk, 1993b; Brown et al., 2000) ou adaptação. A não concordância entre o mapeamento de caracteres e a filogenia proposta (homoplasia) pode ser resultado de convergência adaptativa (McCracken et al., 1999). Já a concordância entre o mapeamento e a filogenia proposta indica que esses caracteres foram fixados ao longo da evolução, isto é, que a distribuição dos caracteres foi atribuída à inércia filogenética, e que esses caracteres são melhores indicadores de filogenia (Schwenk, 1993b; Brown et al., 2000).

O monofiletismo da família Boidae é bem corroborado, mas análises separadas de caracteres morfológicos (Kluge, 1991), moleculares (Austin, 2000), e análises combinadas (Burbrink, 2005) têm levado a hipóteses conflitantes de relação filogenética dos bóideos.

2.3 JUSTIFICATIVA

Os estudos ultra-estruturais de espermatozóide de bóideos incluem a descrição da

cauda do espermatozóide (Austin, 1965), região do pescoço e peça intermediária (Hamilton & Fawcett, 1968) de *Boa constrictor constrictor*. Tourmente et al. (2006) descreveu o espermatozóide de *B. constrictor occidentalis*. Além disso, poucos estudos têm investigado a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide em Squamata (Tavares-Bastos et al., 2002; Vieira et al., 2004), assim, os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide foram mapeados para sabermos se esse caráter é um bom indicador de relações filogenéticas. Desta forma, esse estudo contribui não apenas para aumentar a cobertura taxonômica da família Boidae, como também para um melhor entendimento do uso desses caracteres à medida que investigou a evolução dos caracteres dentro da família Boidae.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Descrever o estado dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide na em três espécies da família Boidae;

2) Investigar a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide na família Boidae, mapeando os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em filogenias morfológica (Kluge, 1991) e molecular (Austin, 2000).

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidos espermatozóides de espécimes adultos de *Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, e *Corallus hortulanus*, coletados na Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil (14° 52'S, 55° 48'W). Os espécimes foram eutanasiados com Tiopental®, os epidídimos foram removidos e cortados em pequenos pedaços. Os espécimes foram depositados na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB 17492, 17495, 17494, respectivamente).

Para a ultra-estrutura de espermatozóide, epidídimos foram fixados overnight a 4°C em solução contendo 2 % de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, e 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, pós fixadas à 4°C por 60 minutos em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8%, e 5mM de cloreto de cálcio em 0,1M de tampão

cacodilato de sódio pH 7,2, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona (30-100%), e incluídas em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram obtidos com faca de diamante em ultramicrótomo Reichert, contrastados em acetato de uranila saturado (3%) e citrato de chumbo (1%), e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® 1011 operado a 80KV. As imagens foram adquiridas com Câmera GATAN BioScan, modelo 792.

Para o estudo da evolução dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em três espécies de bóideos (*Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, e *Corallus hortulanus*), foram codificados 27 caracteres da ultra-estrutura de espermatozóide em estados discretos. Foi investigada a evolução de caracteres em duas filogenias de Boidae baseadas em caracteres morfológicos (Kluge, 1991) e moleculares (Austin, 2000), utilizando MacClade (Maddison & Maddison, 2001), PAUP v. 4.0b 10 (Swofford, 2003), e otimização de Fitch (Kitching et al., 1998). Foram utilizados como grupos externos, *Nerodia sipedon* (Jamieson & Koehler, 1994), *Stegonotus cucullatus*, *Boiga irregularis* (Jamieson 1995a; Oliver et al., 1996) (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae) (Jamieson 1995a; Oliver et al., 1996); *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae) (Jamieson 1995a; Oliver et al., 1996); *Ramphotyphlops* spp (Typhlopidae) (Harding et al., 1995); *Varanus gouldii* (Varanidae) (Jamieson 1995a; Oliver et al., 1996); *Tupinambis merianae* (Teiidae) (Tavares-Bastos et al., 2002); *Iguana iguana* (Iguanidae) (Vieira et al., 2004); e *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae) (Healy & Jamieson, 1994). As relações dos grupos externos foram baseadas nas filogenias propostas por Kluge (1993a; Boidae and *Aspidites melanocephalus*), Vidal & Hedges (2004; Elapidae and Colubridae), e Lee (2005; os grupos externos restantes). Quando várias reconstruções mais parcimoniosas existiram para um caráter, todas as reconstruções foram examinadas.

2.6 RESULTADOS

Apresento aqui um resumo sobre o artigo aceito para publicação no periódico Zoomorphology. “The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes)” (Anexo II).

Após investigarmos a evolução da ultra-estrutura de espermatozóide em três espécies de bóideos (*Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, e *Corallus hortulanus*) os principais resultados obtidos foram os seguintes:

Ultra-estrutura de espermatozóide

O espermatozóide das três espécies de bóideos (*Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, e *Corallus hortulanus*) é filiforme, consistindo de região da cabeça, contendo o núcleo e complexo acrossômico, peça intermediária, e região da cauda subdividida em peça principal e final. O espermatozóide das espécies da família Boidae analisadas (*Boa constrictor amarali*, *Epicrates cenchria*, and *Corallus hortulanus*) difere nos seguintes caracteres: protuberância unilateral da vesícula acrossômica ao nível do cone subacrossomal (presente em *B. c. amarali*, ausente em *E. cenchria* and *C. hortulanus*); placa basal do perforatório (presente e semelhante a um quadrado em *B. c. amarali* e *E. cenchria*, ausente em *C. hortulanus*); e forma da mitocôndria em corte transversal (arredondada em *E. cenchria* e *C. hortulanus*, irregular em *B. c. amarali*). A cauda do espermatozóide de *B. c. constrictor* foi descrita por Austin (1965) e Hamilton & Fawcett (1968). As observações realizadas em *B. c. amarali* discorda apenas em relação ao caráter 26 (membranas multilaminares) que foi considerado um artefato de fixação por Austin (1965). Adicionalmente, foram descritos 9 caracteres na cauda do espermatozóide (11, 12, 16, 20-25) que não foram descritos por esses autores. A descrição do espermatozóide de *Boa constrictor occidentalis* (Tourmente et al., 2006) diferiu de *Boa constrictor amarali* em relação à forma da mitocôndria em corte transversal (circular em *B. c. occidentalis* e irregular em *B. c. amarali*). Além disso, Tourmente et al. (2006) não observou a zona epinuclear lúcida, perforatório, e placa basal do perforatório.

Sinapomorfias

O espermatozóide de *Boa constrictor amarali*, *Epicrates cenchria*, e *Corallus hortulanus* apresenta as seguintes características consideradas sinapomorfias de Squamata (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson 1995a, b, 1999; Oliver et al., 1996): perforatório único e pré-nuclear; perda do canal endonuclear; zona epinuclear lúcida presente; cone subacrossomal paracristalino; cristas mitocondriais lineares; presença de mitocôndria sinuosa; corpos densos intermitocondriais presentes; bainha fibrosa estendendo-se anteriormente na peça intermediária; axonema formando o componente principal da peça intermediária; centríolo distal curto; redução do ânulus; e ombros nucleares arredondados.

A redução ou perda da placa basal do perforatório e da zona epinuclear lúcida, presença de colar denso, de membranas multilaminares, e de microtúbulos extracelulares observados corroboram as sinapomorfias de Serpentes citadas em trabalhos anteriores (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson, 1995a; 1999; Oliver et al., 1996). Não foi observado o excessivo alongamento da peça intermediária nos boídeos, uma suposta sinapomorfia de Serpentes (Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996; Jamieson, 1999). Entretanto em nosso estudo, a peça intermediária não foi observada em sua totalidade em cortes longitudinais observado em microscópio eletrônico de transmissão.

Evolução de caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide

Foram identificadas trinta e uma transformações não ambíguas de caracteres na filogenia morfológica (Kluge, 1991), e trinta transformações não ambíguas de caracteres na filogenia molecular (Austin, 2000), mas apenas treze e doze caracteres são possíveis sinapomorfias, respectivamente (Fig. 4 do anexo II). As outras transformações não ambíguas foram autapomorfias. Foram identificadas também novas sinapomorfias, comuns às duas filogenias: de Serpentes (placa basal do perforatório ausente e arranjo das mitocôndrias em tubos sinuosos em corte oblíquo), de Elapidae + Colubridae (estrutura eletrônica densa no centríolo proximal ausente), e de Boidae (ausência da subdivisão da vesícula acrossômica e presença de fibras 3 e 8 na região mais anterior da peça principal).

2.7 CONCLUSÃO

Os resultados indicam melhor concordância entre a ultra-estrutura de espermatozóide e a filogenia morfológica (Kluge, 1991) do que com a filogenia molecular (Austin, 2000). A integração de biologia comparada, reconstrução filogenética, e história evolutiva podem promover um melhor entendimento da natureza da variação nos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide.

VII. Capítulo 3
ANÁLISE FILOGENÉTICA DE SERPENTES

3.1 RESUMO

A ultra-estrutura de espermatozóide de serpentes foi utilizada para inferir filogenia. Para tanto foi descrita a ultra-estrutura de espermatozóide em nove espécies de serpentes (*Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Oxyrhopus guibei*, *Sibynomorphus mikanii*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*), além de ter sido realizada uma revisão bibliográfica sobre a ultra-estrutura de espermatozóide tanto em espécies de serpentes (*Liotyphlops beui*, *Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*, *Leptotyphlops koppesi*, *Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*, *Aspidites melanocephalus*, *Nerodia sipedon*, *Boiga irregularis*, *Stegonotus cuculatus*, *Oxyuranus microlepidotus*), quanto nos seguintes grupos externos: *Sphenodon punctatus*, *Iguana iguana*, *Heteronotia binoei*, *Lialis burtonis*, *Tupinambis merianae*, *Varanus gouldii*, e *Amphisbaena alba*), para então realizar as análises filogenéticas de serpentes, separadas e combinadas a partir de dados de ultra-estrutura de espermatozóide, osteológicos, e moleculares. Dados osteológicos dos fósseis *Pachyrhachis problematicus* e *Dinilysia patagonica* foram utilizados. As análises mostraram Serpentes dividida em Scolecophidia e Alethinophidia. O grupo Scolecophidia apresentou-se como o mais basal das serpentes atuais e como clado irmão das serpentes do grupo Alethinophidia. As análises mostraram que *P. problematicus* ficou alocado no clado Alethinophidia. Foi encontrado polimorfismo intrafamiliar na ultra-estrutura de espermatozóide nas serpentes, e foi detectado que todas as espécies de serpentes apresentam as sinapomorfias de Squamata e de Serpentes propostas na literatura. Ademais, foram identificadas sete novas sinapomorfias de Serpentes. Finalmente, os resultados sugerem que os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide contêm informação filogenética e podem fornecer caracteres alternativos para as reconstruções filogenéticas de serpentes.

3.2 INTRODUÇÃO

A filogenia de serpentes continua pouco conhecida. Análises anteriores fornecem hipóteses discrepantes e ainda não há um consenso sobre as relações de parentesco entre as famílias de serpentes (Zaher, 1998; McDowell, 2001; Cadle, 2001; Lee & Scanlon, 2002). Porém a divisão basal entre Scolecophidia e Alethinophidia é corroborada tanto por dados morfológicos (Tchernov et al., 2000; McDowell, 2001; Lee & Scanlon, 2002), quanto por dados moleculares (Heise et al., 1995; Cadle, 2001; Slowinski & Lawson, 2002; Vidal & Hedges, 2004).

Apesar do grupo Scolecophidia ter sido considerado parafilético com base em dados morfológicos (Bellairs & Underwood, 1951) e moleculares (Heise et al., 1995), vários estudos morfológicos (Underwood, 1967; Groombridge, 1979; Rieppel, 1988b; Cundall et al., 1993; Scanlon & Lee, 2000; Tchernov et al., 2000) e moleculares (Vidal & Hedges, 2002a, b; Slowinski & Lawson, 2002; Wilcox et al., 2002) sustentam seu monofiletismo. Portanto, as relações filogenéticas entre as famílias de Scolecophidia continuam problemáticas, porém, existe um consenso de que o grupo Scolecophidia seja a forma mais basal das serpentes atuais (Cundall et al., 1993; Heise et al., 1995). Muitos autores inferiram sobre as relações de parentesco entre as famílias de Scolecophidia. Porém, análises prévias fornecem soluções equívocas de relações de parentesco entre as famílias Typhlopidae, Leptotyphlopidae, e Anomalepididae. Uma das hipóteses de parentesco é a de que as famílias Typhlopidae e Anomalepididae são mais relacionadas entre si do que com Leptotyphlopidae. Essa hipótese é sustentada por dados morfológicos (Cundall et al., 1993; Lee & Scanlon, 2002), e moleculares (Vidal & Hedges, 2002b). Por outro lado, outra hipótese defende que as famílias Typhlopidae e Leptotyphlopidae sejam mais próximas entre si do que com Anomalepididae. Essa inferência é corroborada por dados morfológicos (McDowell, 2001) e moleculares (Heise et al., 1995).

As relações de parentesco dentro de Alethinophidia não estão muito bem estabelecidas. Porém, seu monofiletismo é sustentado tanto por dados morfológicos (Zaher & Rieppel, 1999b), quanto por dados moleculares (Slowinski & Lawson, 2002; Vidal & Hedges, 2002a, b; Wilcox et al., 2002). Dentro de Alethinophidia, o grupo Anilioidea é irmão dos

Macrostromata (Tchernov et al., 2000; Apesteguía & Zaher, 2006).

Os Macrostromatas são representados pelos macrostromatas basais (Boidae, Pythonidae, Bolyeriidae, Tropicodphiidae) e Caenophidia (Greene, 1997). As relações de parentesco dentro de Macrostromata são pouco conhecidas (Cundall et al., 1993; Rieppel, 1988b). O suposto parafiletismo dos Macrostromata sugerido pelas análises moleculares (Wilcox et al., 2002) discorda dos resultados obtidos através de dados morfológicos que sustentam seu monofiletismo (Zaher, 1998; McDowell, 2001). Essas evidências conflitantes representam um dos temas mais controversos dentro da discussão sobre as relações filogenéticas em serpentes.

O monofiletismo da família Boidae tem sido bastante discutido. Alguns estudos morfológicos sustentam seu monofiletismo (Kluge, 1991; Lee & Scanlon, 2002), outros separam em duas ou mais linhagens, freqüentemente consideradas famílias distintas (McDowell, 1979). As relações de parentesco da família Boidae também é tema de várias controvérsias. Porém, existe um consenso que os boídeos e pitonídeos sejam grupos irmãos (Kluge, 1991). O monofiletismo de Pythonidae (*Python*, *Liasis*, *Apodora*) é sustentado por dados morfológicos (Kluge, 1993a; Lee & Scanlon, 2002) e moleculares (Vidal & Hedges, 2002b). Zaher (1994) com base em caracteres morfológicos considerou a família Tropicodphiidae não monofilética, mas formada por duas linhagens distintas: *Tropicodphis* e *Trachyboa* (Tropicodphiidae), e *Ungaliophis* e *Exiliboa* (Ungaliophiidae).

O grupo Caenophidia é considerado monofilético por evidências morfológicas (Underwood, 1967; Rieppel, 1988b; Lee & Scanlon, 2002) e moleculares (Heise et al., 1995; Vidal & Hedges, 2002a, b; Slowinski & Lawson, 2002; Wilcox et al., 2002); e é formado por Acrochordidae e o grupo Colubroidea (Tchernov et al., 2000; Rieppel & Zaher, 2001b; Slowinski & Lawson, 2002; Lee & Scanlon, 2002; Vidal & Hedges, 2002a, b; Kelly et al., 2003).

Colubroidea forma um grupo monofilético sustentado tanto por dados morfológicos (Zaher, 1999; Lee & Scanlon, 2002), quanto por dados moleculares (Heise et al., 1995; Slowinski & Lawson, 2002; Lawson et al., 2005). É representado pelas famílias Colubridae, Elapidae, e Viperidae (Rieppel, 1988a), e para alguns autores também pela

família Atractaspididae (Cadle, 1988; Heise et al., 1995). As relações filogenéticas entre as famílias Colubridae, Elapidae, e Viperidae e o monofiletismo dessas famílias são temas muito discutidos (Heise et al., 1995; McDowell, 2001). De acordo com algumas inferências as famílias Viperidae e Elapidae são grupos monofiléticos (Underwood, 1967; Lee & Scanlon, 2002; Lawson et al., 2005). Já para Heise et al. (1995) os elapídeos não são monofiléticos. Para Cadle (1988) os colubrídeos e elapídeos são grupos irmãos, mais aparentados a *Atractaspis*, e esse clado aparentado a Viperidae. Para Heise et al. (1995) a família Viperidae é grupo irmão de Elapidae e Colubridae. Já para Pinou et al. (2004) Elapidae é o grupo irmão de Colubridae e esse clado irmão de Viperidae. Utilizando termos diferentes Dessauer et al. (1987) e Lawson et al., (2005) sugeriram que a família Viperidae forma o grupo irmão das outras serpentes denominadas de modernas (Caenophidia) por Dessauer et al., (1987) e de Colubroidea por Lawson et al., (2005). Para Vidal & Hedges (2002b) a família Elapidae é mais aparentada a Atractaspididae, esse grupamento seria mais aparentado a Colubridae, e Viperidae seria a família mais basal dessas três famílias.

Os representantes da família Colubridae compreendem a grande maioria das serpentes atuais, sendo amplamente distribuídos por quase todos os continentes. Quase todos os colubrídeos neotropicais atuais pertencem a uma das três linhagens propostas por Cadle (Cadle, 1984a, b, c, 1985; Cadle & Greene, 1993): 1) Colubrines, cuja distribuição é cosmopolita, e seu monofiletismo tem sido sugerido por dados moleculares (Cadle, 1984a, b; Heise et al., 1995, Lawson et al., 2005); 2) Xenodontines da América Central, definidos por Zaher (1999) como subfamília Dipsadinae; e 3) Xenodontines da América do Sul, definidos por Zaher (1999) como subfamília Xenodontinae sensu stricto. Um dilema crescente acerca da sistemática da família Colubridae é a constante redefinição dos grupos de espécies por diferentes autores, além da grande diversidade do grupo, que dificulta sua caracterização (Zug et al., 2001; Pough et al., 2004), assim questões básicas acerca das relações de parentesco entre as principais linhagens da família Colubridae e seu monofiletismo permanecem obscuras (Cadle, 1984a, b, c; 1985; Dessauer et al., 1987). Um dos maiores problemas atuais da sistemática das serpentes é a relação de parentesco

entre a família Colubridae e as outras famílias de Colubroidea (Ferrarezzi, 1994).

A ultra-estrutura de espermatozóide tem sido utilizada para inferências filogenéticas (Jamieson 1995a; Jamieson et al., 1996; Oliver et al., 1996; Teixeira et al., 1999a, b; Vieira et al., 2005, 2007).

3.3 JUSTIFICATIVAS

A ultra-estrutura de espermatozóide tem sido utilizada para reconstrução filogenética em gêneros e famílias de Squamata pois sua utilidade é defendida por vários autores pelo fato desse conjunto de caracteres conter significativa informação filogenética (Jamieson, 1995a, b; Jamieson et al., 1996; Oliver et al., 1996; Teixeira et al., 1999a, b, c, d; Vieira et al., 2005, 2007). Porém, ainda não está claro qual nível taxonômico o uso da ultra-estrutura de espermatozóide é mais proveitoso, nem o grau de variabilidade existente em nível de família, portanto investigar a variabilidade na ultra-estrutura do espermatozóide em diferentes categorias taxonômicas é essencial para identificar o melhor nível taxonômico a ser utilizado em análise filogenética (Teixeira et al., 1999a, b). Variabilidade na ultra-estrutura de espermatozóide tem sido encontrada em várias famílias de serpentes. Caracteres polimórficos (variáveis) foram definidos por Kitching et al. (1998) como qualquer tipo de variabilidade existente em um determinado caráter em um táxon sob estudo. Para Wiens (1995, 1998, 1999) os caracteres variáveis contêm sinal filogenético, e apesar dos problemas que envolvem sua inclusão em análises filogenéticas, sua exclusão é injustificável e pode diminuir a exatidão das análises. Por esse motivo os caracteres polimorfismos encontrados na ultra-estrutura de espermatozóide em algumas famílias de serpentes foram utilizados.

Apesar de vários estudos, ainda não se chegou a um consenso quanto às relações de parentesco entre as famílias de serpentes (Cadle, 2001; Kluge, 1991; Heise et al., 1995; Zaher, 1998; Lee, 1998; 2000; Zug et al., 2001; McDowell, 2001; Lee & Scanlon, 2002), tornando-se de fundamental importância a realização de estudos. Assim, com o objetivo de contribuir para o esclarecimento dessas relações de parentesco esse tema foi abordado.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Descrever os estados dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide em famílias de serpentes (Aniliidae, Cyliodrophiidae, Tropidophiidae, Acrochordidae, Viperidae, Colubridae, e Elapidae), comparando com dados de famílias descritas anteriormente nos capítulos 1 (Anomalepididae, Typhlopidae, Leptotyphlopidae) e 2 (Boidae);

2) Comparar os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide nas espécies representantes das famílias de serpentes com os grupos externos (Sphenodontidae, Iguanidae, Gekkonidae, Pygopodidae, Teiidae, Varanidae e Amphisbaenidae).

3) Avaliar a utilidade filogenética da ultra-estrutura de espermatozóide em nível de família.

4) Conduzir análises filogenéticas separadas e combinadas, utilizando conjuntos de dados morfológicos (ultra-estrutura de espermatozóide e osteológicos), e moleculares (C-mos, 12S e 16S).

3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

I) *Conjunto de dados*

A lista de caracteres é apresentada no anexo III, e matriz de dados no anexo IV. Os dados utilizados nas análises filogenéticas foram os seguintes:

1) *Ultra-estrutura de espermatozóide*

Dados da literatura: foram utilizados dados de serpentes: *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae) (Harding et al., 1995); *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae) (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996); *Boiga irregularis* (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), *Stegonotus cuculatus* (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996), *Nerodia sipedon* (Jamieson & Koehler, 1994) (Colubridae); e *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae) (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996). Grupos externos: *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae) (Healy & Jamieson, 1994); *Iguana iguana* (Iguanidae) (Vieira et al., 2004); *Heteronotia binoei* (Gekkonidae) (Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996); *Lialis burtonis* (Pygopodidae)

(Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996); *Tupinambis merianae* (Teiidae) (Tavares-Bastos et al., 2002); *Varanus gouldii* (Varanidae) (Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996); e *Amphisbaena alba* (Amphisbaenidae) (Teixeira et al., 1999a).

Material observado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB: foram utilizados espécimes machos reprodutivos depositados na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB), Coleção Herpetológica do Instituto Butantan (IB), e Coleção Herpetológica do Museu de História Natural de Londres (MW).

O espermatozóide das espécies *Anilius scytale* (Aniliidae) (IB 66553); *Cylindrophis ruffus* (Cylindrophidae) (MW 4348); *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophidae) (IB 10087); *Acrochordus javanicus* (Acrochordidae) (MW 4432); *Bothrops jararaca* (Viperidae) (IB 72074); *Sibynomorphus mikanii* (IB 72073), *Oxyrhopus guibei* (IB 72047), *Xenopholis scalaris* (CHUNB 47138) (Colubridae); e *Micrurus corallinus* (Elapidae) (IB 72011) foram descritos no desenvolvimento dessa tese e estão descritas nesse capítulo. Foram utilizados os estudos ultra-estruturais de espermatozóide realizados no capítulo 1 nas espécies de *Liotyphlops beui* (Anomalepididae), *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae), *Leptotyphlops koppesi* (Leptotyphlopidae) (Tavares-Bastos et al., 2007a), e no capítulo 2 nas espécies de *Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, e *Epicrates cenchria* (Boidae) (Tavares-Bastos et al., 2007b). As referências bibliográficas dos dados dos capítulos 1 (Scolecoptidia) e 2 (Boidae), e os obtidos na literatura não serão repetidas e podem ser também acessadas na tabela 3.

Espermatozóides foram fixados para Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Para Microscopia de Luz, espermatozóides foram fixados em 2 % de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, analisados e fotografados em microscópio Axiophot Zeiss, equipado com contraste interferencial, para estabelecer-se medidas de tamanho das regiões que compõem o espermatozóide.

Para Microscopia Eletrônica de Transmissão, os epidídimos dissecados foram fixados overnight a 4°C em solução contendo 2 % de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, e 3% de sacarose, tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, acrescidos de 5 mM de cloreto de

cálcio. O material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, pós fixados à 4°C por 60 minutos em tetróxido de ósmio 1%, e ferricianeto de potássio 0,8%, e novamente lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. A amostra foi desidratada em soluções de concentrações crescentes de acetona (30- 100%), embebidas e incluídas em resina Spurr. Cortes ultrafinos obtidos em ultramicrotomo Reichert, utilizando faca de diamante foram contrastados em acetato de uranila saturado (3%) e citrato de chumbo 1%; examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® 1011 operado a 80KV.

O material dos espécimes *Liotyphlops beui*, *Anilius scytale*, e *Tropidophis paucisquamis* provenientes da Coleção Herpetológica do Instituto Butantan, foram reidratados em soluções decrescentes de álcool (70-30%), lavados em água destilada, e posteriormente em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Como teste foram utilizados a partir daqui dois procedimentos, no primeiro o material foi fixado, pós-fixado, seguindo para a etapa da desidratação. No outro procedimento o material foi apenas pós-fixado, em seguida desidratado. Nos dois procedimentos os resultados obtidos foram similares em relação à boa visualização no Microscópio Eletrônico de Transmissão.

2) Osteológicos

Foram utilizados caracteres de Rieppel & Zaher (2000a). Porém, os táxons terminais em nosso estudo são espécies, e Rieppel & Zaher (2000a) utilizaram Scolecophidia, Anilioidea, Macrostromata, Iguanidae, Gekkonidae, Pygopodidae, Amphisbaenia, e Teiidae. Assim, os estados de caracteres desses grupos foram utilizados para todos os seus representantes em nossa matriz de dados. Foram utilizados também os fósseis *Pachyrhachis problematicus* e *Dinilysia patagonica* (Rieppel & Zaher, 2000a).

Para os caracteres 124, 126, e 154, os estados dos caracteres de outros artigos foram utilizados na tentativa de quebrar os táxons terminais.

Caráter 136: Contato entre o palatino e vômer: (0) curto; (1) extenso. Foram utilizados os dados de Lee & Scanlon (2002) para *Leptotyphlops* ssp., *Typhlops* ssp., *Liotyphlops* ssp., *Cylindrophis ruffus*, *Anilius scytale*, e *Tropidophis* ssp. Caráter 138:

Palatino: (0) tão longo quanto o vômer; (1) metade do comprimento do vômer; (2) curto antero-posteriormente (muito menor do que o vômer); (3) longo antero-posteriormente (muito maior do que o vômer). Foram utilizados os dados de Lee & Scanlon (2002) para *Leptotyphlops* ssp., *Typhlops* ssp., *Liotyphlops* ssp., *Cylindrophis ruffus*, *Anilius scytale*, *Tropidophis* ssp., *Aspidites melanocephalus*, *Boa constrictor*, e *Acrochordus javanicus*. Caráter 166: Coronóide: (0) contacta o esplênico; (1) não contacta o esplênico. Foram utilizados os dados de Kluge (1993b) para *Tropidophis* ssp., *Cylindrophis* ssp., e *Anilius* ssp.; e Kluge (1991) para *Boa constrictor* e *Epicrates cenchria*.

3) Moleculares

Foram utilizadas seqüências de nucleotídeos de RNA ribossômico 12S e 16S, e do gene nuclear C-mos obtidos no GenBank, das seguintes espécies e seus respectivos números do GenBank.

Fragmento 12S ribossomal: *Liotyphlops albirostris* (AF366693) (Hedges et al., não publicado), *Typhlops pusillus* (AF366761) (Hedges et al., não publicado), *Leptotyphlops columbi* (Z46462) (Heise et al., 1995), *Anilius scytale* (AF544753) (Vidal & Hedges, 2002b), *Cylindrophis ruffus* (AF544744) (Vidal & Hedges, 2002b), *Boa constrictor* (Z46470) (Heise et al., 1995), *Epicrates cenchria* (AF368059) (Vences et al., 2001), *Python molurus* (AF236682) (Tong et al., não publicado), *Tropidophis melanurus* (AF544757) (Vidal & Hedges, 2002b), *Acrochordus javanicus* (Z46472) (Heise et al., 1995), *Boiga cynodon* (Z46468) (Heise et al., 1995), *Nerodia sipedon* (AF402630) (Alfaro & Arnold, 2001), *Oxyrhopus rhombifer* (AY046573) (Sineriz et al., não publicado), *Bothrops asper* (AF057218) (Parkinson, 1999), e *Micrurus surinamensis* (AF544770) (Vidal & Hedges, 2002b). Grupos externos: *Sphenodon punctatus* (L28076) (Hedges, 1994), *Iguana iguana* (AB028742) (Ota et al., não publicado), *Lialis burtonis* (AF090183) (Donnellan et al., 1999), *Tupinambis teguixin* (AY359490) (Hower & Hedges, 2003), e *Varanus gouldii* (AF004492) (Fuller et al., 1998).

Fragmento 16S ribossomal: *Liotyphlops albirostris* (AF366762) (Hedges, não publicado), *Typhlops pusillus* (AF366832) (Hedges, não publicado), *Leptotyphlops columbi*

(Z46488) (Heise et al., 1995), *Anilius scytale* (AF544826) (Vidal & Hedges, 2002b), *Cylindrophis ruffus* (AF544817) (Vidal & Hedges, 2002b), *Boa constrictor* (AF215275) (Vences et al., 2001), *Epicrates cenchria* (AF215273) (Vences et al., 2001), *Python curtus* (AF215277) (Vences et al., 2001), *Tropidophis melanurus* (AF544830) (Vidal & Hedges, 2002b), *Acrochordus javanicus* (Z46502) (Heise et al., 1995), *Boiga cynodon* (AF139568) (Rawlings et al., não publicado), *Oxyrhopus melanogenys* (AF158489) (Vidal et al., 2000), *Bothrops asper* (AF057265) (Parkinson, 1999), e *Micrurus surinamensis* (AF544799) (Vidal & Hedges, 2002b), Grupos externos: *Sphenodon punctatus* (DQ267621) (Miller, não publicado), *Iguana iguana* (AB028756) (Ota et al., não publicado), *Lialis burtonis* (AY134527) (Jennings et al., 2003), *Tupinambis teguixin* (AY359510) (Hower & Hedges, 2003).

Fragmento C-mos nuclear: *Liotyphlops albirostris* (AF544727) (Vidal & Hedges, 2002b), *Ramphotyphlops braminus* (AY099980) (Slowinski & Lawson, 2002), *Typhlops jamaicensis* (AF544733) (Vidal & Hedges, 2002b), *Leptotyphlops columbi* (AF544718) (Vidal & Hedges, 2002b), *Anilius scytale* (AY099965) (Slowinski & Lawson, 2002), *Cylindrophis ruffus* (AF471133) (Lawson et al., 2005), *Boa constrictor* (AF471115) (Lawson et al., 2005), *Epicrates striatus* (AY099966) (Slowinski & Lawson, 2002), *Aspidites melanocephalus* (DQ465557) (Noonan & Chippindale, 2006), *Tropidophis melanurus* (AF544725) (Vidal & Hedges, 2002b), *Acrochordus granulatus* (AF544706) (Vidal & Hedges, 2002b), *Boiga dendrophila* (AF471128) (Lawson et al., 2005), e *Micrurus fulvius* (AY058935) (Slowinski & Lawson, não publicado). Grupos externos: *Sphenodon punctatus* (AF039483) (Saint et al., 1998), *Iguana iguana* (AF148708) (Harris et al., 1999), *Lialis burtonis* (AY134563) (Jennings et al., 2003), *Tupinambis quadrilineatus* (AY217889) (Whiting et al., 2003), *Varanus salvator* (AF435017) (Jing et al., não publicado), e *Amphisbaena alba* (AY444016) (Kearney & Stuart, 2004).

O alinhamento foi realizado utilizando o programa T-COFFEE (Notredame & Abergel, 2003).

II) *Análises Filogenéticas*

Os programas PAUP* v.4.0b10 (Sowfford, 2002) e MacClade v.4.06 (Maddison & Maddison, 2001) foram utilizados para a elaboração da matriz de dados e realização das análises filogenéticas, as quais foram conduzidas através de buscas do tipo heurística, pegando os táxons com adição do tipo “stepwise”.

Foram realizadas análises separadas, onde foram analisados os dados morfológicos (espermatozóide e osteológicos) e moleculares. Foram realizadas também análises combinadas dos diferentes conjuntos de dados (morfológicos e moleculares).

Foi utilizado TBR (“tree-bisection-reconnection”) como algoritmo para permuta dos ramos.

Foi utilizada a otimização de estados de caracteres do tipo ACCTRAN, e otimização de Fitch (Fitch, 1971) (caracteres não ordenados e reversíveis), e todos os caracteres tiveram pesos iguais.

Para a realização das análises no PAUP* v.4.0b10 (Sowfford, 2002), a relação dos grupos externos foi constrangida de acordo com a hipótese de Lee (2005) da seguinte forma (*Sphenodon*, (*Iguana*, ((*Amphisbaena*, (*Lialis*, *Heteronotia))), (*Tupinambis*, (*Varanus*, *Serpentes*)))))) no MacClade v.4.06 (Maddison & Maddison, 2001).*

Para todas as análises foi utilizada seqüência aleatória de adição com 1.000 réplicas, pegando 10 árvores a cada réplica.

Para as análises molecular e combinada os “gaps” foram considerados como desconhecidos (“missing”).

Quando o caráter possuía mais de um estado nas análises morfológica e combinada foi considerado como polimórfico.

Para avaliar o grau de sustentação de cada clado foram utilizados os valores de “bootstrap”, utilizando o programa PAUP* v.4.0b10 (Sowfford, 2002) através de buscas heurísticas aleatórias com 1.000 réplicas avaliadas em cada busca. Foram utilizados os valores de “bootstrap” para avaliar o suporte dos clados (Felsenstein, 1985; Hillis & Bull, 1993). Foi utilizado o algoritmo TBR (“tree-bisection-reconnection”) para permuta dos ramos. Nesta etapa a relação dos grupos externos também foi constrangida de acordo com

a hipótese de Lee (2005).

3.6 RESULTADOS

3.6.1 ESTUDO COMPARATIVO DA ULTRA-ESTRUTURA DE ESPERMATOZÓIDE EM LEPIDOSAURIA

Foi realizado um estudo comparativo tanto em espécies de serpentes, quanto em outros representantes de Lepidosauria sumarizados nas tabelas 2 e 3.

Alguns caracteres de *Liotyphlops beui* (Anomalepididae) (Tavares-Bastos et al., 2007a), *Anilius scytale* (Aniliidae), e *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae) não foram obtidos devido à qualidade do material proveniente de Coleção Herpetológica.

A seguir segue a descrição dos 34 caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide e seus estados nas serpentes e grupos externos.

Região da cabeça

1- Complexo acrossomal, protuberância unilateral da vesícula acrossômica ao nível do cone subacrossomal. (0) **ausente:** Typhlopidae (*Ramphotyphlops waitii*, *Typhlops reticulatus*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppersi*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Nerodia sipedon*, *Stegonotus*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (1) **presente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); *Micrurus corallinus* (Elapidae); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi obtida informação sobre esse caráter em *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae) e *Xenopholis scalaris* (Colubridae).

2- Complexo acrossomal, espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e o cone subacrossomal (0) **ausente:** Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*);

Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); *Boa constrictor*, *Epicrates cenchria* (Boidae); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (1) **presente:** *Corallus hortulanus* (Boidae); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi possível obter informação sobre esse caráter em *Liotyphlops beui* (Anomalepididae), Aniliidae (*Anilius scytale*), *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae), *Xenopholis scalaris* (Colubridae), e *Micrurus corallinus* (Elapidae).

3- Complexo acrossomal, subdivisão da vesícula acrossômica em córtex e medula (0) **ausente:** Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Ramphotyphlops waitii*, *Typhlops reticulatus*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Gekkonidae (*Heteronotia binoei*). Não foi obtida informação sobre esse caráter em *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae) e *Xenopholis scalaris* (Colubridae).

4- Complexo acrossomal, forma na região mais anterior. (0) **circular:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus*

cucullatus, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii* e *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); e Pygopodidae (*Lialis burtonis*). (1) **achatada:** *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi possível obter informação sobre o estado desse caráter em *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae) e *Xenopholis scalaris* (Colubridae).

5- Complexo acrossomal, cone subacrossomal. (0) **paracristalino:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*), (*Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*), (*Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*), (*Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **não paracristalino:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). Em *Nerodia sipedon*, Jamieson & Koehler (1994) citaram que o cone subacrossomal não seria paracristalino, porém esse estado requer confirmação, por esse motivo esse estado foi considerado como desconhecido. Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) citaram que o cone subacrossomal teria estrutura paracristalina apenas em *Boiga irregularis* (Colubridae), *Stegonotus cucullatus* (Colubridae), e *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae), mas esse estado foi considerado válido também para *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae).

6- Complexo acrossomal, espaço entre vesícula acrossômica e perforatório. (0) **ausente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*);

Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente:** *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae). Não foi possível obter informação sobre esse caráter em *Xenopholis scalaris* (Colubridae).

7- Complexo acrossomal, zona epinuclear lúcida. (0) **ausente:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); e Gekkonidae (*Heteronotia binoei*). (1) **presente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi obtida informação sobre esse caráter em *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae); e *Xenopholis scalaris* (Colubridae). Para Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) a zona epinuclear lúcida está ausente em *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae), porém esse estado foi considerado como desconhecido.

8- Complexo acrossomal, número de perforatório. (0) **dois:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (1) **um:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops*

jararaca); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi obtida informação desse caráter em *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae) e *Xenopholis scalaris* (Colubridae).

9- Complexo acrossomal, ponta do perforatório. (0) **afilada**: *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); *Nerodia sipedon* (Colubridae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **arredondada**: *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Sibynomorphus mikanii*) (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (2) **quadrada**: Pygopodidae (*Lialis burtonis*). Não foi possível obter informação sobre esse caráter em *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae); *Liotyphlops beui* (Anomalepididae); *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae); *Oxyrhopus guibei* e *Xenopholis scalaris* (Colubridae). Para Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) a ponta do perforatório é afilada em *Aspidites melanocephalus*, *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, e *Oxyuranus microlepidotus*. Porém, esse estado foi considerado válido apenas para *Aspidites melanocephalus*, tendo as outras espécies o estado arredondada.

10- Complexo acrossomal, placa basal do perforatório. (0) **ausente**: *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); *Corallus hortulanus* (Boidae); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente**: *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); *Boa constrictor*, *Epicrates cenchria* (Boidae); *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus*

mikanii (Colubridae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (2) **não aplicável:** *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae), porque nesse táxon ocorre a presença de canais endonucleares. Não adquirimos informação sobre esse caráter em Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); e *Micrurus corallinus* (Elapidae). Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) sugeriram uma densificação na base do cone subacrossomal no espermatozóide de *Boiga irregularis* e *Oxyuranus microlepidotus*, porém, através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, a placa basal do perforatório foi considerada ausente nessas duas espécies.

11- Complexo acrossomal, forma da placa basal do perforatório. (0) **arredondada:** Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (1) **semelhante a um quadrado:** *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); *Boa constrictor*, *Epicrates cenchria* (Boidae); *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae). (2) **não aplicável:** para os táxons que não possuem a placa basal do perforatório como *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); *Corallus hortulanus* (Boidae); *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae); *Acrochordus javanicus* (Acrochordidae); *Bothrops jararaca* (Viperidae); *Boiga irregularis*, *Nerodia sipedon* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae); e *Amphisbaena alba* (Amphisbaenidae); e ainda *Micrurus corallinus* (Elapidae) pois não foi obtida informação sobre a presença ou ausência da placa basal. Não foi obtida informação desse caráter em *Lialis burtonis* (Pygopodidae); *Liotyphlops beui* (Anomalepididae); *Anilius scytale* (Aniliidae); *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae); *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae). Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996), e Tavares-Bastos et al. (2002), respectivamente, utilizaram para a forma da placa basal a denominação ovoidal em *Varanus gouldii*, e cilíndrica em *Tupinambis merianae*. A terminologia arredondada foi utilizada nesse estudo como equivalente a ovoidal e cilíndrica pois apresentam o mesmo aspecto quando observados

no Microscópio Eletrônico de Transmissão.

12- Canal endonuclear. (0) **ausente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*).

13- Núcleo, lacuna. (0) **ausente:** Boidae (*Boa constrictor*, *Epicrates cenchria*, *Corallus hortulanus*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (1) **presente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Micrurus corallinus* (Elapidae); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (2) **não aplicável:** em *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae), pois nesse táxon ocorre a presença de canais endonucleares. Não adquirimos informação sobre esse caráter em *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae).

Peça intermediária

14- Região do pescoço, estrutura laminar estratificada. (0) **ausente:** *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae) e Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (1) **presente:**

Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cylindrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); *Micrurus corallinus* (Elapidae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*).

15- Região do pescoço, projeção da estrutura laminar estratificada. (0) **unilateral:** *Xenopholis scalaris* (Colubridae). (1) **bilateral:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cylindrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); *Nerodia sipedon*, *Boiga irregularis*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Micrurus corallinus* (Elapidae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Varanidae (*Varanus gouldii*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (2) **não aplicável:** *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae) e Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*) pois nesses táxons não há ocorrência da estrutura laminar estratificada. Não foi possível obter informação sobre o estado desse caráter em *Lialis burtonis* (Pygopodidae); *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); *Stegonotus cucullatus* (Colubridae). Para Jamieson & Koehler (1994) o espermatozóide de *Nerodia sipedon* tem o estado desse caráter como questionável, porém como mencionado anteriormente, foi considerado bilateral. Teixeira et al. (1999a) citaram que o espermatozóide de *Amphisbaena alba* (Amphisbaenidae) apresenta estrutura laminar estratificada unilateral, através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, foi considerado como bilateral. Jamieson (1995a) e Jamieson et al.

(1996) citaram a ausência de estrutura laminar estratificada em *Heteronotia binoei*, porém foi considerado presente e bilateral. Em relação à estrutura laminar estratificada, para Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) o espermatozóide de *Boiga irregularis* apresenta o estado unilateral, porém através de observações pessoais no decorrer da revisão bibliográfica, foi considerado como bilateral. Em *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae) os autores citaram que possivelmente apresentaria o estado bilateral, estado esse que foi confirmado através de observações pessoais no decorrer da revisão bibliográfica. Ademais, não foram mencionadas as outras serpentes estudadas por eles, que foram considerados como desconhecido em *Stegonotus cucullatus* (Colubridae), e ausente em *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae).

16- Região do pescoço, estrutura eletron-densa no centríolo proximal. (0) **ausente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Boiga irregularis*, *Nerodia sipedon*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); e Teiidae (*Tupinambis merianae*). (1) **presente:** *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodromidae (*Cyliodromus rufus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); *Stegonotus cucullatus*, *Sibynomorphus mikanii*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi obtida informação desse caráter em *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae), *Micrurus corallinus* (Elapidae); *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae); e *Lialis burtonis* (Pygopodidae). Para Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) ocorre a presença de estrutura elétron-densa no centríolo proximal em *Stegonotus cucullatus*, *Boiga irregularis*, *Oxyuranus microlepidotus*, e *Aspidites melanocephalus*. Porém, através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, foi considerada a ausência desse caráter em *Oxyuranus microlepidotus* e *Boiga irregularis*.

17- Região do pescoço, colar denso. (0) **ausente:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae

(*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppersi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); e Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*).

18- Peça intermediária, fibras 3 e 8 na região mediana da peça intermediária. (0) **muito espessas**; (1) **espessas**. Essas fibras apresentaram-se espessas em todas as espécies abordadas nessa tese.

19- Peça intermediária, principal componente axial. (0) **centriolar:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (1) **axonemal:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppersi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*).

20- Peça intermediária, cristas mitocondriais. (0) **concêntrica:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (1) **linear:** Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppersi*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus*

javanicus); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi possível obter informação sobre o estado desse caráter em *Liotyphlops beui* (Anomalepididae) e em *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae). Harding et al. (1995) na descrição do espermatozóide de *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae) citou que as cristas mitocondriais seriam circulares, porém foi considerado como linear. Healy & Jamieson (1994) utilizaram o termo esféricas para a forma das cristas mitocondriais em *Sphenodon punctatus* (Sphenodontidae), porém foi utilizada concêntrica, que significa o mesmo estado com outra denominação. Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) citaram a presença de cristas mitocondriais longitudinais em *Varanus gouldii* (Varanidae), porém foram consideradas como lineares.

21- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte oblíquo. (0) **colunar:** Iguanidae (*Iguana iguana*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **túbulos sinuosos:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae); e *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae). (2) **arredondada:** *Xenopholis scalaris* (Colubridae) e Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (3) **túbulos retos não colunares:** *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) e *Micrurus corallinus* (Elapidae). Não adquirimos informação sobre esse caráter em *Heteronotia binoei* (Gekkonidae); *Lialis burtonis* (Pygopodidae); e *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae). Em *Nerodia sipedon*, Jamieson & Koehler (1994) consideraram que as mitocôndrias, em corte oblíquo, estariam dispostas em zig-zag ou túbulos retos, porém

através de observações pessoais no decorrer da revisão bibliográfica, foram consideradas com arranjo em túbulos sinuosos. Vieira et al. (2004) em sua descrição do espermatozóide de *Iguana iguana* (Iguanidae) citaram que as mitocôndrias, em corte oblíquo, apresentariam arranjo levemente curvo, porém através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, esse arranjo foi considerado como colunar. Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) citaram a presença de mitocôndrias em túbulos sinuosos, em corte oblíquo, apenas em *Stegonotus cucullatus* (Colubridae) e *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae). Esse estado foi considerado válido também para *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae) e *Boiga irregularis* (Colubridae).

22- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte longitudinal. **arredondada:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); e Pygopodidae (*Lialis burtonis*). (1) **colunar:** Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (2) **irregular:** *Xenopholis scalaris* (Colubridae). Não adquirimos informação sobre esse caráter em *Heteronotia binoei* (Gekkonidae); *Lialis burtonis* (Pygopodidae); e *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae). Vieira et al. (2004) consideraram que o espermatozóide de *Iguana iguana* (Iguanidae) apresentaria mitocôndrias arredondadas, em corte longitudinal, porém através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, foi considerado como colunar.

23- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte transversal. (0) **arredondada:** Typhlopidae (*Ramphotyphlops waitii*, *Typhlops reticulatus*); Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria* (Boidae); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*);

Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Nerodia sipedon*, *Stegonotus cucullatus*, *Oxyrhopus guibei*, *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae); e Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); e Gekkonidae (*Heteronotia binoei*). (1) **irregular:** Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); *Boa constrictor* (Boidae); e (*Xenopholis scalaris*) (Colubridae). (2) **trapezoidal:** Iguanidae (*Iguana iguana*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Para Jamieson (1995a) e Jamieson et al. (1996) as mitocôndrias em corte transversal, são ovóides em *Heteronotia binoei* (Gekkonidae), entretanto, o termo arredondada foi utilizado que tem o mesmo significado ultra-estrutural. Jamieson (1995a) e Oliver et al. (1996) citaram que no espermatozóide de *Varanus gouldii* ocorrem mitocôndrias ovais, em corte transversal, porém através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, foram consideradas irregulares, com diversas formas.

24- Peça intermediária, aspecto dos corpos densos. (0) **sólido:** Varanidae (*Varanus gouldii*). (1) **granular:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophidae (*Cyndrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Vieira et al. (2004) em sua descrição do espermatozóide de *Iguana iguana* (Iguanidae) citaram que os corpos densos apresentavam aspecto granular e sólido, entretanto, através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, foi considerado apenas sólido.

25- Peça intermediária, localização dos corpos densos. (0) **intramitocondrial**: Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (1) **intermitocondrial**: Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*).

26- Peça intermediária, corpos densos em corte transversal. (0) corpos densos localizados parcialmente entre mitocôndrias e bainha fibrosa: Gekkonidae (*Heteronotia binoei*). (1) corpos densos e mitocôndrias justapostos à bainha fibrosa: Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Não foi obtida informações sobre o estado desse caráter em *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae). Harding et al. (1995) em sua descrição do espermatozóide de *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae) não mencionaram o aspecto (caráter 24), a localização (caráter 25), nem a disposição dos corpos densos entre as mitocôndrias e a bainha fibrosa na peça intermediária (caráter 26),

por isso, os estados desses caracteres foram considerados como desconhecidos.

27- Peça intermediária, bainha fibrosa. (0) não na peça intermediária: Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (1) na peça intermediária: Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*).

28- Região do pescoço, centríolo distal. (0) **circundado apenas por colar denso:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*). (1) **circundado por colar denso e mitocôndrias:** Aniliidae (*Anilius scytale*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); e Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*). (2) **circundado por mitocôndrias e/ou corpos densos:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). Pelo fato de o colar denso e os corpos densos terem origem comum (Austin, 1965; Hamilton & Fawcett, 1968; Oliver et al., 1996) não se pode afirmar se o observado se trata de colar denso ou de corpo denso.

29- Peça intermediária, início da bainha fibrosa. (0) **nível da quarta mitocôndria:**

Teiidae (*Tupinambis merianae*). (1) **nível da segunda mitocôndria:** Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (2) **nível da primeira mitocôndria:** Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); *Nerodia sipedon*, *Stegonotus cucullatus*, *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae); Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*); e Pygopodidae (*Lialis burtonis*). (3) **antes da primeira mitocôndria:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Ramphotyphlops waitii*, *Typhlops reticulatus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); *Boiga irregularis*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae). (4) **nível do ânulos:** em Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). (5) **não aplicável:** Aniliidae (*Anilius scytale*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); e Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*), pelo fato de o centríolo distal ser circundado por colar denso e mitocôndrias nesses táxons.

30- Peça intermediária, ânulos. (0) **ausente**; (1) **presente**: em todas as espécies abordadas nessa tese. Nas serpentes é bem reduzido.

31- Peça intermediária, forma do ânulos. (0) **triangular:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); *Boa constrictor*, *Epicrates cenchria* (Boidae); Iguanidae (*Iguana iguana*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **linear:** Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); *Boiga irregularis*, *Nerodia sipedon*, *Oxyrhopus guibei*, *Sibynomorphus mikanii*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (2) **arredondado:** Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); *Stegonotus cucullatus* (Colubridae); e Gekkonidae (*Heteronotia binoei*). (3) **trapezóide:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*). Em *Corallus hortulanus* (Boidae) esse caráter apresenta-se tanto triangular quanto linear. Não adquirimos informação sobre esse caráter em *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); *Anilius scytale* (Aniliidae); e Elapidae (*Micrurus*

corallinus, *Oxyuranus microlepidotus*).

Região da cauda

32- Peça principal, fibras 3 e 8 no início da peça principal. (0) **ausente:** Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); e Varanidae (*Varanus gouldii*). (1) **presente:** Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Typhlopidae (*Ramphotyphlops waitii*, *Typhlops reticulatus*); Aniliidae (*Anilius scytale*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Epicrates cenchria*, *Corallus hortulanus*); Tropidophiidae (*Tropidophis paucisquamis*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Micrurus corallinus* (Elapidae); Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*).

Dois caracteres, membranas multilaminares e microtúbulos extracelulares envolvem todas as regiões do espermatozóide nas serpentes.

33- Membranas multilaminares. (0) **ausente:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Teiidae (*Tupinambis merianae*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente:** Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Cyndrophiiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Xenopholis scalaris* (Colubridae); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); e Pygopodidae (*Lialis burtonis*). Não foi obtida informação sobre esse caráter em *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae); *Liotyphlops beui* (Anomalepididae); *Anilius scytale* (Aniliidae); *Oxyrhopus guibei* (Colubridae); e *Micrurus corallinus* (Elapidae).

34- Microtúbulos extracelulares. (0) **ausente:** Sphenodontidae (*Sphenodon punctatus*); Iguanidae (*Iguana iguana*); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); Pygopodidae (*Lialis burtonis*); Teiidae (*Tupinambis meriana*); Varanidae (*Varanus gouldii*); e Amphisbaenidae (*Amphisbaena alba*). (1) **presente:** Typhlopidae (*Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii*); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppesi*); Cyliodrophiidae (*Cyliodrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*); *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae); Gekkonidae (*Heteronotia binoei*); e Pygopodidae (*Lialis burtonis*). Não foi possível obter informação sobre o estado desse caráter em *Liotyphlops beui* (Anomalepididae); *Anilius scytale* (Aniliidae); *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiidae), e *Micrurus corallinus* (Elapidae). Jamieson (1995a) e Jamieson et al. (1996) citaram a presença de microtúbulos extracelulares circundando o espermatozóide de *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae) e *Boiga irregularis* (Colubridae), porém através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, esse estado foi considerado válido também para *Stegonotus cucullatus* (Colubridae) e *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae).

Tabela 2. Lista de caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide e seus estados.

Caráter	Estados
1- Complexo acrossomal, protuberância unilateral da vesícula acrossômica ao nível do cone subacrossomal	(0) ausente; (1) presente.
2- Complexo acrossomal, espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e o cone subacrossomal	(0) ausente; (1) presente.
3- Complexo acrossomal, subdivisão da vesícula acrossômica	(0) ausente; (1) presente.
4- Complexo acrossomal, forma na região mais anterior	(0) circular; (1) achatada.
5- Complexo acrossomal, cone subacrossomal	(0) paracristalino; (1) não paracristalino.
6- Complexo acrossomal, espaço entre vesícula acrossômica e perforatório	(0) ausente; (1) presente.
7- Complexo acrossomal, zona epinuclear lúcida	(0) ausente; (1) presente.
8- Complexo acrossomal, número de perforatório	(0) dois; (1) um.
9- Complexo acrossomal, ponta do perforatório	(0) afilada; (1) arredondada; (2) quadrada.
10- Complexo acrossomal, placa basal do perforatório	(0) ausente; (1) presente; (2) não aplicável.
11- Complexo acrossomal, forma da placa basal do perforatório	(0) arredondada; (1) semelhante a um quadrado; (2) não aplicável.
12- Canal endonuclear	(0) ausente; (1) presente.
13- Núcleo, lacuna	(0) ausente; (1) presente; (2) não aplicável.
14- Região do pescoço, estrutura laminar estratificada	(0) ausente; (1) presente.
15- Região do pescoço, projeção da estrutura laminar estratificada	(0) unilateral; (1) bilateral; (2) não aplicável.
16- Região do pescoço, estrutura eletron-densa no centríolo proximal	(0) ausente; (1) presente.
17- Região do pescoço, colar denso	(0) ausente; (1) presente.
18- Peça intermediária, fibras 3 e 8 na região mediana da peça intermediária	(0) muito espessas; (1) espessas.
19- Peça intermediária, principal componente axial	(0) centriolar; (1) axonemal.
20- Peça intermediária, cristas mitocondriais	(0) concêntrica; (1) linear.

21- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte oblíquo	(0) colunar; (1) túbulos sinuosos; (2) arredondada; (3) túbulos retos não colunares.
22- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte longitudinal	(0) arredondada; (1) colunar; (2) irregular.
23- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte transversal	(0) arredondada; (1) irregular; (2) trapezóide.
24- Peça intermediária, aspecto dos corpos densos	(0) sólido; (1) granular.
25- Peça intermediária, localização dos corpos densos	(0) intramitocondrial; (1) intermitocondrial. (0) corpos densos localizados parcialmente entre mitocôndrias e bainha fibrosa; (1) corpos densos e mitocôndrias justapostos à bainha fibrosa.
26- Peça intermediária, corpos densos em corte transversal	(0) não na peça intermediária; (1) na peça intermediária.
27- Peça intermediária, bainha fibrosa	(0) circundado apenas por colar denso; (1) circundado por colar denso e mitocôndrias; (2) circundado por mitocôndrias e/ou corpos densos.
28- Região do pescoço, centríolo distal	(0) nível da quarta mitocôndria; (1) nível da segunda mitocôndria; (2) nível da primeira mitocôndria; (3) antes da primeira mitocôndria; (4) nível do ânulos; (5) não aplicável.
29- Peça intermediária, início da bainha fibrosa	(0) ausente; (1) presente.
30- Peça intermediária, ânulos	(0) triangular, (1) linear; (2) arredondado; (3) trapezóide.
31- Peça intermediária, forma do ânulos	(0) ausente; (1) presente.
32- Peça principal, fibras 3 e 8 no início da peça principal	(0) ausente; (1) presente.
33- Membranas multilaminares	(0) ausente; (1) presente.
34- Microtúbulos extracelulares	(0) ausente; (1) presente.

Tabela 3. Matriz dos caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide e respectivos estados nas serpentes (em negrito) e grupos externos, e suas respectivas fontes.

Táxon	1	2	3	4	Fonte
<i>Liotyphlops beui</i>	1?100011??	?01111111?	100011103101??		Tavares-Bastos et al., 2007a
<i>Typhlops reticulatus</i>	0011001101	1011111111	10001110310111		Tavares-Bastos et al., 2007a
<i>Ramphotyphlops waitii</i>	001001?110	20????1111	100???1031?111		Harding et al., 1995
<i>Leptotyphlops koppesi</i>	0010001111	1011101111	10101110311111		Tavares-Bastos et al., 2007a
<i>Anilius scytale</i>	1?1000111?	?011111111	1000111151?1?1		Este estudo
<i>Cylindrophis ruffus</i>	1010001111	1011111111	10001110110111		Este estudo
<i>Boa constrictor</i>	0001001111	1001111111	10101110210111		Tavares-Bastos et al., 2007b
<i>Corallus hortulanus</i>	1101001110	2001111111	10001110210,1111		Tavares-Bastos et al., 2007b
<i>Epicrates cenchria</i>	1001001111	1001111111	10001110210111		Tavares-Bastos et al., 2007b
<i>Aspidites melanocephalus</i>	001000?100	2001111111	10001111511011		Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996
<i>Tropidophis paucisquamis</i>	????0?????	?01111111?	??0011103111??		Este estudo
<i>Acrochordus javanicus</i>	1110001110	2001111111	10001111512111		Este estudo
<i>Bothrops jararaca</i>	1010001110	2011101111	10001110111111		Este estudo
<i>Boiga irregularis</i>	0010001110	2001101111	10001110311011		Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996
<i>Nerodia sipedon</i>	1010?01101	1001101111	10001110211111		Jamieson & Koehler, 1994
<i>Stegonotus cucullatus</i>	0010001110	200??11111	10001110212011		Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	1010001111	1011111111	10001110211111		Este estudo
<i>Oxyrhopus guibei</i>	10100011?1	1011101111	30001110311111		Este estudo
<i>Xenopholis scalaris</i>	????0?????	?011011111	22101110311111		Este estudo
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	0010001110	2000201111	1000111021?011		Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996
<i>Micrurus corallinus</i>	1?1000111?	20111?1111	3000111021?1?1		Este estudo
<i>Sphenodon punctatus</i>	00001000?2	21202?0100	20000102413100		Healy & Jamieson, 1994
<i>Iguana iguana</i>	1011001101	0001110111	01201112110100		Vieira et al., 2004
<i>Heteronotia binoei</i>	0010000101	0001110111	?1001012112010		Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996
<i>Lialis burtonis</i>	0000?01121	?00??011?	?0001112211?10		Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996
<i>Tupinambis merianae</i>	0011001101	0011100111	01101112010000		Tavares-Bastos et al., 2002
<i>Varanus gouldii</i>	1011001111	0001110111	01111112111000		Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996
<i>Amphisbaena alba</i>	1101001100	2011110111	01201112110100		Teixeira et al., 1999a

3.6.2 ESTUDO COMPARATIVO DA ULTRA-ESTRUTURA DE ESPERMATOZÓIDE EM SERPENTES

O espermatozóide de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Oxyrhopus guibei*, *Sibynomorphus mikanii*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus* é filiforme, composto de região da cabeça, peça intermediária, e região da cauda (Figs. 1, 2A). O espermatozóide de *B. jararaca* está representado diagramaticalmente na figura 1, e o de *S. mikanii*, observado em microscopia de luz, pode ser observado na figura 2A.

A forma da região mais anterior do complexo acrossômico é circular em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Fig. 2D). O acrossoma é formado por vesícula acrossômica (Figs. 2B-I) e cone subacrossomal paracristalino (Figs. 2B-C, F-I). A subdivisão da vesícula acrossômica em córtex e medula está presente em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Figs. 2B, D). Dentro da vesícula acrossômica está localizado o perforatório (Figs. 2B-C, E). A ponta do perforatório é arredondada em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, e *M. corallinus* (Fig. 2B). Foi observada placa basal do perforatório semelhante a um quadrado em *C. ruffus*, *S. mikanii*, e *O. guibei* (Figs. 2C, 5D), e sua ausência em *A. javanicus* e *B. jararaca* (Figs. 2B, 5C). A zona epinuclear lúcida está presente em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Figs. 2C, F, H). A protuberância unilateral da vesícula acrossômica no nível do cone subacrossomal está presente em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Fig. 2F-H). O espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e o cone subacrossomal está presente em *A. javanicus* (Figs. 2G, 5A), e ausente em *C. ruffus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, e *O. guibei* (Figs. 2H-I, 5B). Os ombros nucleares arredondados situam-se na base do complexo acrossomal (Figs. 1, 2B). O núcleo é alongado (Fig. 2B) e circular (Fig. 2J, K), apresentando lacuna em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, *X. scalaris*, e *M. corallinus* (Figs. 2J, 5E), e a ausência de lacuna em *A. javanicus* (Figs. 2K, 5F). O núcleo na porção mais anterior forma o rostro nuclear (Figs. 1, 2B-C). Na base do núcleo situa-se a fossa

nuclear (Figs. 1, 3A-G). A região do pescoço consiste de centríolos proximal e distal, material pericentriolar, e colar denso (Figs. 3 A-C, E-F), ou de colar denso e mitocôndrias (Fig. 3D, G). O centríolo proximal contém nove triplas de microtúbulos (Figs. 3A, C, F). A estrutura eletron-densa no centríolo proximal está presente em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *A. javanicus*, *S. mikanii*, e *X. scalaris* (Figs. 3G, 5I), e ausente em *B. jararaca* e *O. guibei* (Figs. 3F, 5J). A estrutura laminar estratificada bilateral foi observada em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Figs. 3B, D, F-G, 5G), e seu estado unilateral foi observado em *X. scalaris* (Figs. 3E, 5H). O centríolo apresenta-se tanto circundado apenas por colar denso (*C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *S. mikanii*, *X. scalaris*, *O. guibei*, *B. jararaca*, e *M. corallinus*) (Figs. 3A-C, E-F, J, 5R, S), quanto por colar denso e mitocôndrias (*A. scytale* and *A. javanicus*) (Figs. 3D, G, K, 5T, U). O axonema é circundado por bainha fibrosa, mitocôndrias (Figs. 3A-D, H-I, L-M), e corpos densos (Figs. 3A, M). Fibras 3 e 8 espessas no meio da peça intermediária foram observadas destacadas de suas respectivas duplas (Figs. 3L-M, 5P-Q). Cristas mitocondriais lineares foram observadas (Figs. 3B, D, H-I, K-L, 4D-E, 5N-Q, U- α). Em corte oblíquo as mitocôndrias apresentaram-se como túbulos sinuosos em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, e *S. mikanii* (Figs. 4A, 5K), arredondadas em *X. scalaris* (Figs. 4B, 5L), e túbulos retos não colunares em *O. guibei* e *M. corallinus* (Figs. 4C, 5M). Em corte longitudinal, mitocôndrias arredondadas foram observadas em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Figs. 3A-D, I, 4D-F, 5N), e irregular em *X. scalaris* (Figs. 3H, 5O). Em corte transversal, as mitocôndrias apresentaram-se arredondadas em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Figs. 3L, 5Q), e irregular em *X. scalaris* (Figs. 3M, 5P). Corpos densos intermitocondriais sólidos e mitocôndrias apresentaram-se justapostos a bainha fibrosa (Figs. 3A, M, 5N-O, X- α). O início da bainha fibrosa na peça intermediária ocorre no nível da primeira mitocôndria em *S. mikanii* e *M. corallinus* (Figs. 3A, 5W), no nível da segunda mitocôndria em *C. ruffus* e *B. jararaca* (Figs. 3B, 5V), e antes da primeira mitocôndria em *T. paucisquamis*, *O. guibei*, e *X. scalaris* (Figs. 3C, 5Y). O fim da peça intermediária é marcada pelo ânulos,

que apresenta-se triangular em *C. ruffus* (Figs. 4D, 5X), linear em *T. paucisquamis*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *X. scalaris* (Figs. 4E, 5Z), e arredondado em *A. javanicus* (Figs. 4F, 5α). As fibras 3 e 8 estão presentes no início da peça final (Fig. 4G), porém sua porção final não apresenta essas fibras (Fig. 4H). O arranjo de microtúbulos é mantido na região anterior da peça final (Fig. 4I), tornando-se desorganizado na porção posterior (Fig. 4J). Circundando o espermatozóide foram observados membranas multilaminares (Figs. 2B-C, E-K; 3A, D-E, G-H, J-M; 4D, F), e microtúbulos extracelulares (Figs. 2B, E-G, I, K; 3D, I, K-M; 4A, G, I).

Variabilidade intrafamiliar

Foram encontrados 11 caracteres polimórficos na ultra-estrutura de espermatozóide de serpentes (Fig. 5). 1- Presença do espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e o cone subacrossomal apenas em *A. javanicus* (Fig. 5A), e sua ausência em *C. ruffus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, e *O. guibei* (Fig. 5B). 2- Ausência da placa basal do perforatório apenas em *A. javanicus* e *B. jararaca* (Fig. 5C), e sua presença em *C. ruffus*, *S. mikanii*, e *O. guibei*. 3- Placa basal do perforatório semelhante a um quadrado em *C. ruffus*, *S. mikanii*, e *O. guibei* (Fig. 5D). 4- Presença da lacuna nuclear em *Anilius scytale*, *C. ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus* (Fig. 5E), e sua ausência em *A. javanicus* (Fig. 5F). 5- Estrutura laminar estratificada bilateral em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Fig. 5G), e estrutura laminar estratificada unilateral apenas em *X. scalaris* (Fig. 5H). 6- Estrutura eletrônica densa no centríolo proximal em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *A. javanicus*, *S. mikanii*, e *X. scalaris* (Fig. 5I), e sua ausência em *B. jararaca* e *O. guibei* (Fig. 5J). 7- Em corte oblíquo, as mitocôndrias com arranjo em túbulos sinuosos são encontradas em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, e *S. mikanii* (Fig. 5K), as arredondadas são encontradas em *X. scalaris* (Fig. 5L), e o arranjo das mitocôndrias em túbulos retos não colunares são encontradas em *O. guibei* e *M. corallinus* (Fig. 5M). 8- Em corte longitudinal, as mitocôndrias são arredondadas em *A. scytale*, *C. ruffus*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e

M. corallinus (Fig. 5N), e irregulares em *X. scalaris* (Fig. 5O). 9- Em corte transversal, as mitocôndrias são arredondadas em *A. scytale*, *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *A. javanicus*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *M. corallinus* (Fig. 5Q), e irregulares em *X. scalaris* (Fig. 5P). 10- O centríolo distal é circundado apenas por colar denso em *C. ruffus*, *T. paucisquamis*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, *X. scalaris*, e *M. corallinus* (Figs. 5R, S). *A. scytale* e *A. javanicus* apresentam o centríolo proximal circundado por colar denso e mitocôndria (Figs. 5T, U). 11- Nas espécies de serpentes estudadas, o início da bainha fibrosa na peça intermediária ocorre em vários níveis. Ao nível da segunda mitocôndria em *C. ruffus* e *B. jararaca* (Fig. 5V); ao nível da primeira mitocôndria em *S. mikanii* e *M. corallinus* (Fig. 5W); e antes da primeira mitocôndria em *T. paucisquamis*, *O. guibei*, e *X. scalaris* (Fig. 5Y). 12- Ânulus em forma de triângulo em *C. ruffus* (Fig. 5X), linear em *T. paucisquamis*, *B. jararaca*, *S. mikanii*, *O. guibei*, e *X. scalaris* (Fig. 5Z), e arredondada em *A. javanicus* (Fig. 5α). Foi observada a existência de variabilidade intrafamiliar nas famílias Typhlopidae, Boidae, Colubridae, e Elapidae.

Em algumas serpentes a relação numérica entre mitocôndrias e corpos densos difere da maioria dos outros Squamata. Apesar dessa relação numérica não ter sido utilizada para análise filogenética, acredito que são características importantes a serem citadas. No espermatozóide de *Liotyphlops beui* (Anomalepididae), *Typhlops reticulatus*, *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae), *Leptotyphlops koppesi* (Leptotyphlopidae), *Anilius scytale* (Aniliidae), *Cylindrophis ruffus* (Cylindrophiiidae), *Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria* (Boidae), *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae), *Tropidophis paucisquamis* (Tropidophiiidae), *Acrochordus javanicus* (Acrochordidae), *Bothrops jararaca* (Viperidae), e *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae) ocorrem muito mais mitocôndrias do que corpos densos, o que ocorre também em *Iguana iguana* (Iguanidae). Em *Xenopholis scalaris*, *Oxyrhopus guibei*, *Nerodia sipedon* (Colubridae), e *Micrurus corallinus* (Elapidae) a quantidade de mitocôndrias é um pouco maior do que a de corpos densos, semelhante ao observado em *Amphisbaena alba* (Amphisbaenidae). Já em *Boiga irregularis* e *Stegonotus cucullatus* (Colubridae) e *Oxyuranus microlepidotus* (Elapidae) a quantidade de mitocôndrias e corpos densos são similares. A mesma relação

foi observada em *Heteronotia binoei* (Gekkonidae), *Tupinambis merianae* (Teiidae), e *Varanus gouldii* (Varanidae). Apenas no espermatozóide de *Lialis burtonis* (Pygopodidae) ocorrem mais corpos densos do que mitocôndrias.

3.6.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Foram encontradas sete novas sinapomorfias não ambíguas de Serpentes: região mais anterior do complexo acrossômico achatada, ponta do perforatório arredondada; placa basal do perforatório semelhante a um quadrado, mitocôndria com arranjo em túbulos sinuosos em corte oblíquo, mitocôndria arredondadas em corte longitudinal e transversal, e fibras 3 e 8 presentes no início da peça principal. Embora mitocôndrias em túbulos sinuosos tenha sido considerado uma sinapomorfia de Squamata por Harding et al. (1995), Healy & Jamieson (1994), Jamieson (1995a, b, 1999), e Oliver et al. (1996) os resultados indicaram que esse estado de caráter é uma suposta sinapomorfia não ambígua de Serpentes.

1) Análise Morfológica

Foram codificados 259 caracteres morfológicos, dos quais 158 são informativos. Os dados morfológicos produziram 3468 árvores igualmente parcimoniosas com 730 passos, índice de consistência igual a 0,78, e índice de retenção 0,76.

A árvore de consenso da maioria (Fig. 6A) mostra Serpentes dividida em dois grupos (Scolecophidia e Alethinophidia). No grupo Scolecophidia *Liotyphlops beui* aparece como o táxon mais basal do grupo Scolecophidia, irmão do grupamento formado por *Ramphotyphlops waitii* e por *Leptotyphlops koppesi* + *Typhlops reticulatus*. *Dinilysia patagonica* aparece como táxon irmão de Alethinophidia. Dentro de Alethinophidia, o clado formado por *Cylindrophis ruffus* e *Anilius scytale* é o mais basal. *Acrochordus javanicus* + *Corallus hortulanus*, *Bothrops jararaca* + *Micrurus corallinus*, e *Oxyuranus microlepidotus* + *Boiga irregularis* formam uma politomia com *Aspidites melanocephalus*, *Stegonotus cucullatus*, *Pachyrhachis problematicus*. Esse grupo é mais aparentado a *Nerodia sipedon*, *Boa constrictor*, e *Epicrates cenchria*, que têm posição incerta. Esse

clado é mais aparentado a *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Tropidophis paucisquamis*, mas *O. guibei* tem posição incerta. As famílias Typhlopidae, Boidae, Colubridae, e Elapidae apresentaram-se como grupos parafiléticos.

A árvore de “bootstrap” (Fig. 6B) mostra que dentro de serpentes, o clado formado por todas as serpentes do grupo Scolecophidia (*Liotyphlops beui*, *Ramphotyphlops waitii*, *Leptotyphlops koppesi*, e *Typhlops reticulatus*) é altamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 95%. A relação do fóssil *Dinilyisia patagonica* como táxon irmão de todas as serpentes do grupo Alethinophidia é moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 84%. O clado formado por *Cylindrophis ruffus* e *Anilius scytale* é altamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 98%. O grupo formado por *Acrochordus javanicus*, *Aspidites melanocephalus*, *Bothrops jararaca*, *Micrurus corallinus*, *Oxyuranus microlepidotus*, *Xenopholis scalaris*, *Oxyrhopus guibei*, *Sibynomorphus mikanii*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Boiga irregularis*, *Epicrates cenchria*, *Corallus hortulanus*, *Boa constrictor*, *Tropidophis paucisquamis*, e o fóssil *Pachyrhachis problematicus* é moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 84%. O grupamento *C. ruffus* + *A. scytale* e o restante das serpentes do grupo Alethinophidia é fracamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 54%.

2) Análise Molecular

Foram utilizados 3054 caracteres moleculares, dos quais 621 são informativos. A análise de dados moleculares produziu uma árvore mais parcimoniosa com 3017 passos, índice de consistência de 0,60, e índice de retenção de 0,38.

A árvore mais parcimoniosa (Fig. 7A) mostra Serpentes dividida em dois grupos (Scolecophidia e Alethinophidia). O grupo Scolecophidia apresentou-se monofilético e o mais basal, formado por dois clados. Um formado por *Ramphotyphlops braminus* e *Typhlops* spp., resultando no monofiletismo da família Typhlopidae. Outro, representado por *Leptotyphlops columbi* e *Liotyphlops albirostris*.

No clado Alethinophidia, *Acrochordus* spp. e *Cylindrophis ruffus* são mais aparentados a *Python* spp. Esse clado é mais aparentado a *Boa constrictor* e *Epicrates*

spp., os quais formam a família monofilética Boidae. Esse agrupamento é mais aparentado ao clado onde *Bothrops* spp. é o táxon mais basal. *Boiga* spp. aparece mais aparentado ao clado formado por *Micrurus* spp., *Oxyrhopus* spp. + *Nerodia sipedon*. O agrupamento de *Anilius scytale* e *Tropidophis* spp. + *Aspidites melanocephalus* ficou na posição mais basal de Alethinophidia. Análise de parcimônia resultou no parafiletismo de Pythonidae e Colubridae.

A árvore de “bootstrap” (Fig. 7B) mostra que o grupo Scolecophidia é altamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 91%, e que dentro de Scolecophidia o clado representado por *Ramphotyphlops braminus* e *Typhlops* spp. moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 81%. O clado formado por *Leptotyphlops columbi* e *Liotyphlops albirostris* é moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 70%. O clado Alethinophidia (*Anilius scytale*, *Acrochordus* spp., *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis* spp., *Python* spp., *Aspidites melanocephalus*, *Boa constrictor*, *Epicrates* spp., *Bothrops* spp., *Micrurus* spp., *Nerodia sipedon*, *Oxyrhopus* spp., e *Boiga* spp.) é moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 85%. Dentro de Alethinophidia, o clado formado por *Boa constrictor* e *Epicrates* spp. é fracamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 58%. O clado formado por *Boiga* spp., *Nerodia sipedon*, *Oxyrhopus* spp., e *Micrurus* spp. é moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 80%. A relação de parentesco de *Bothrops* spp. como táxon irmão do último grupo é fracamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 66%.

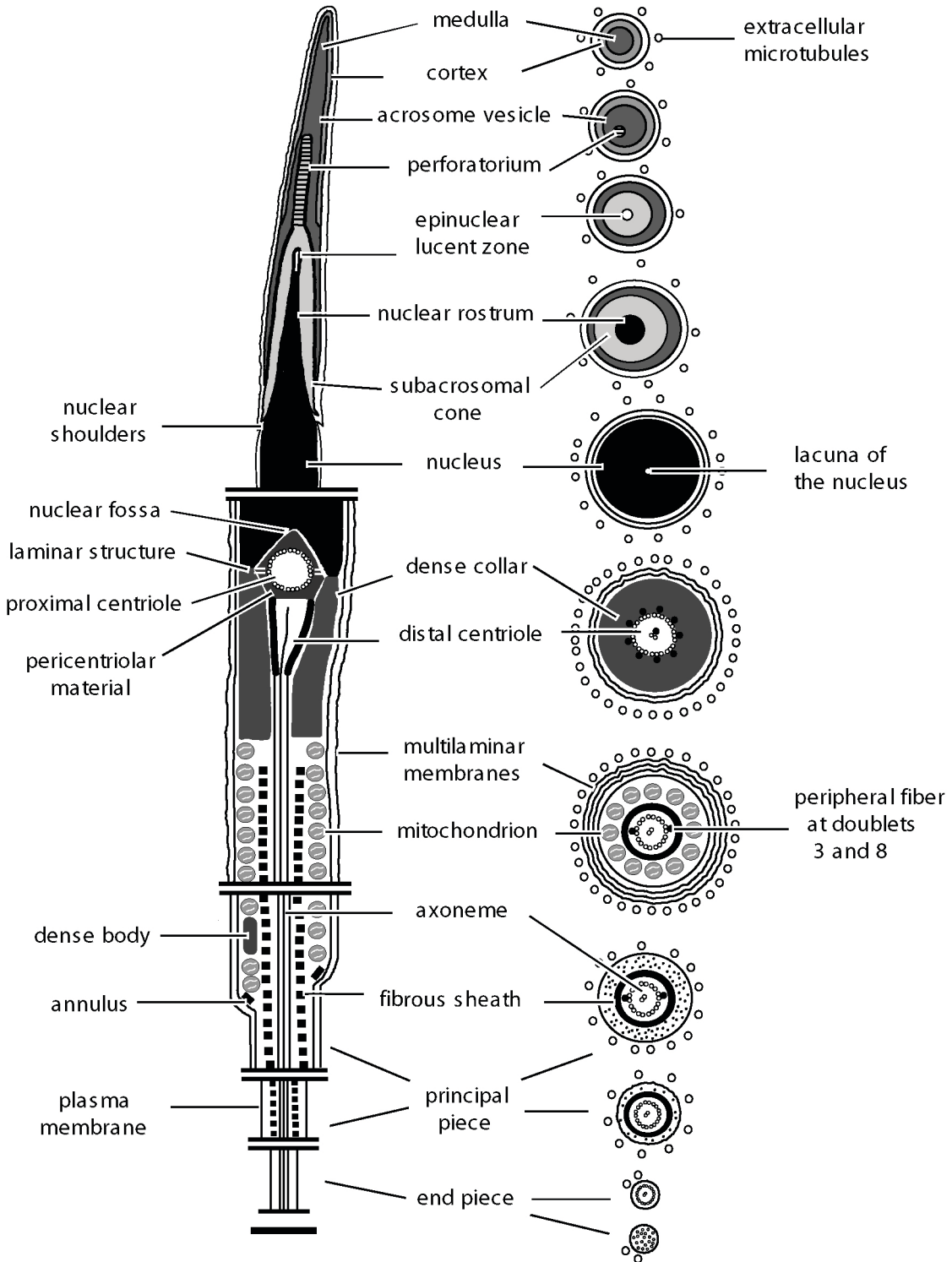
3) Análise Combinada

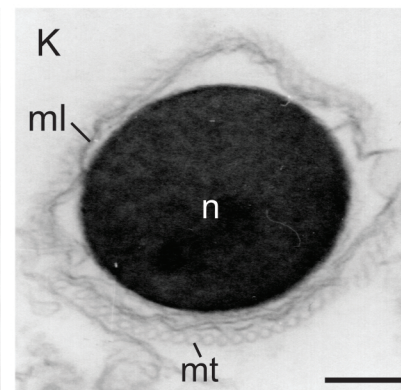
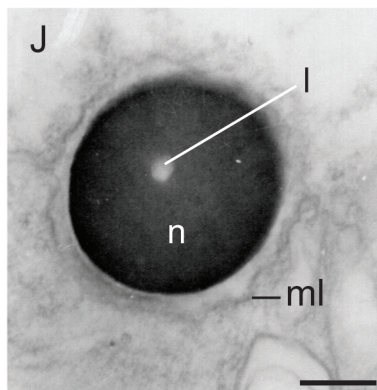
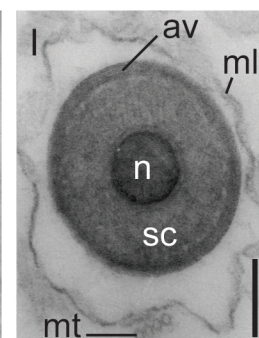
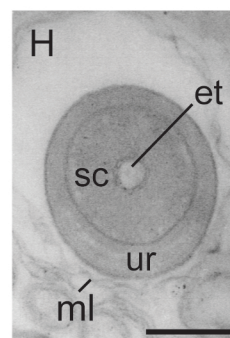
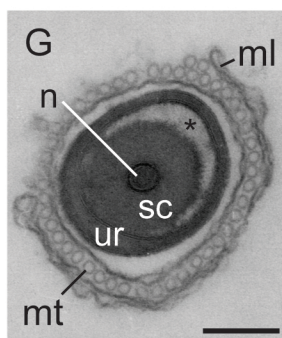
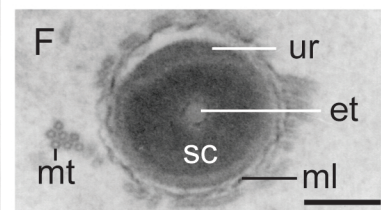
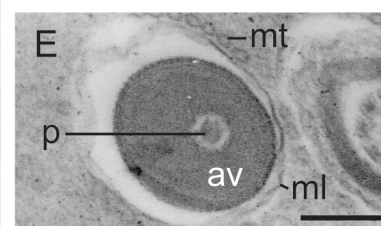
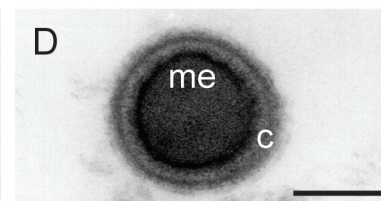
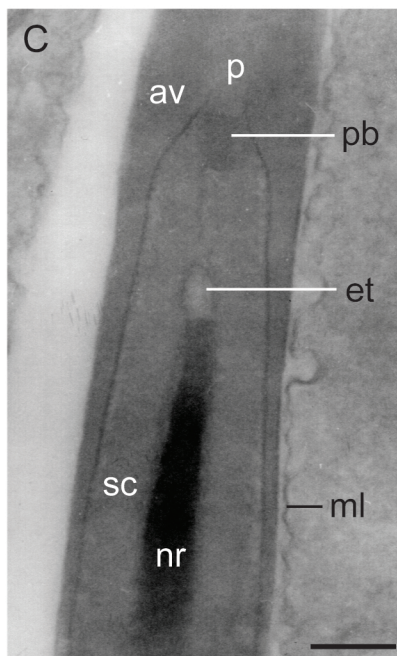
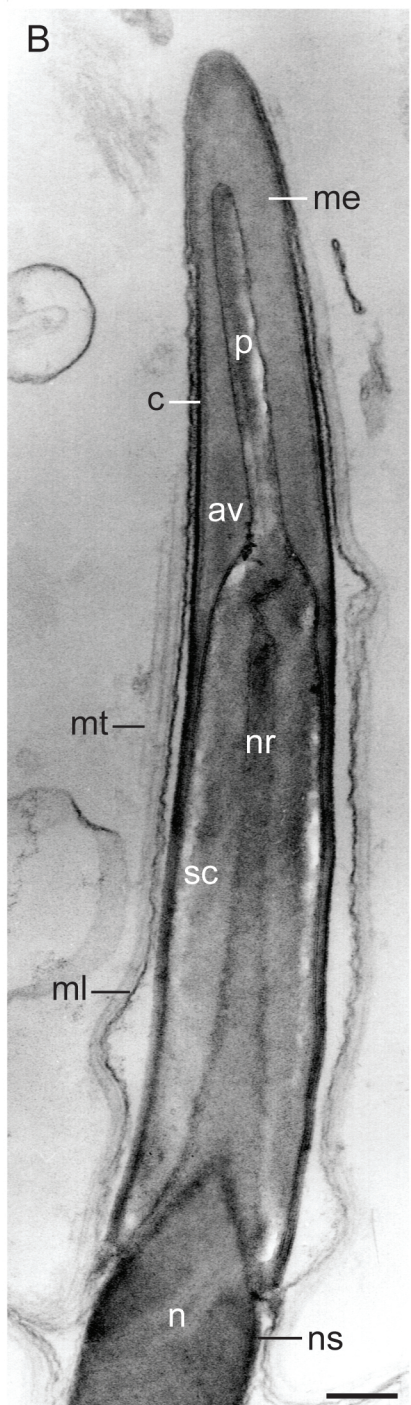
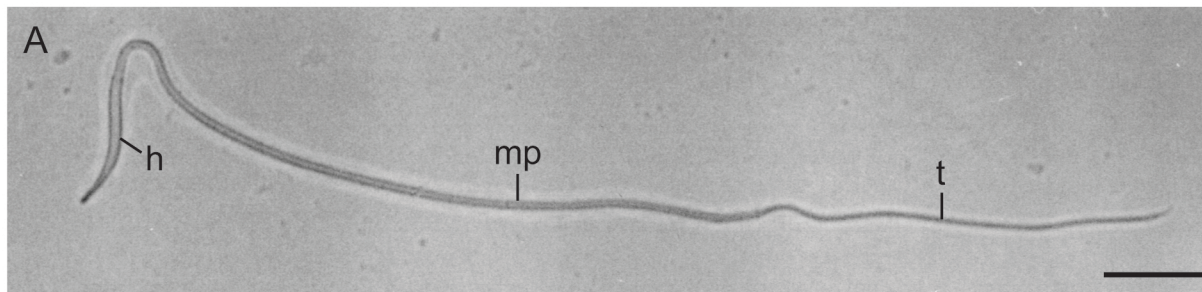
Foram codificados 3313 caracteres, dos quais 778 são informativos. As análises combinadas produziram 29 cladogramas igualmente parcimoniosos, com 3767 passos, índice de consistência de 0,63, e índice de retenção de 0,47.

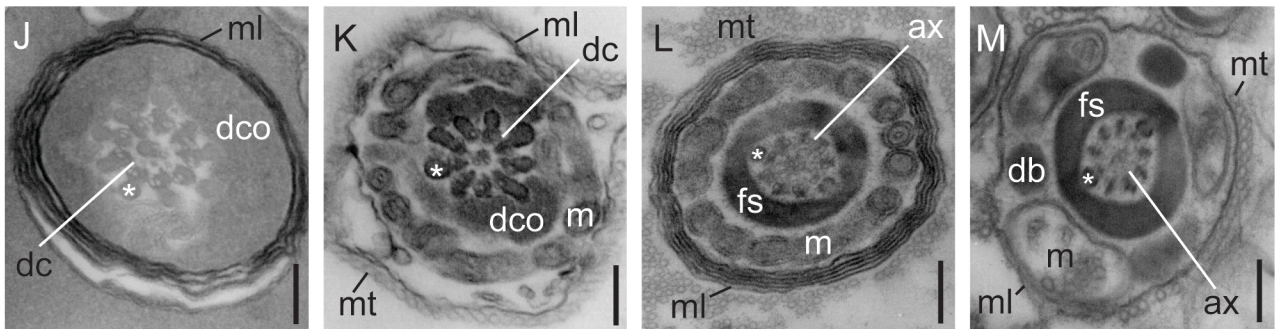
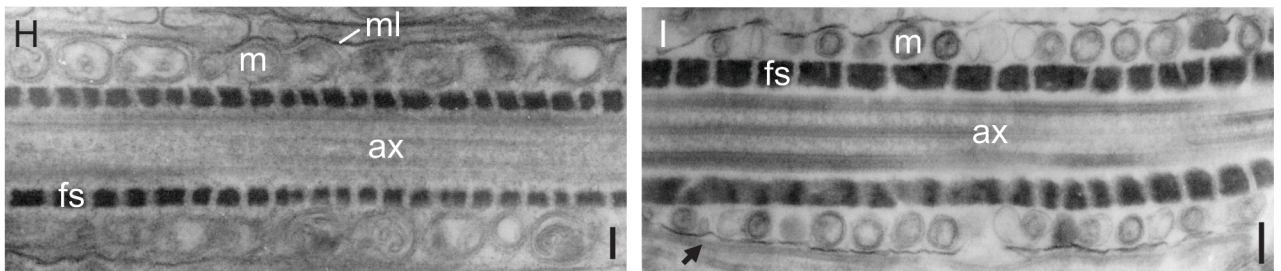
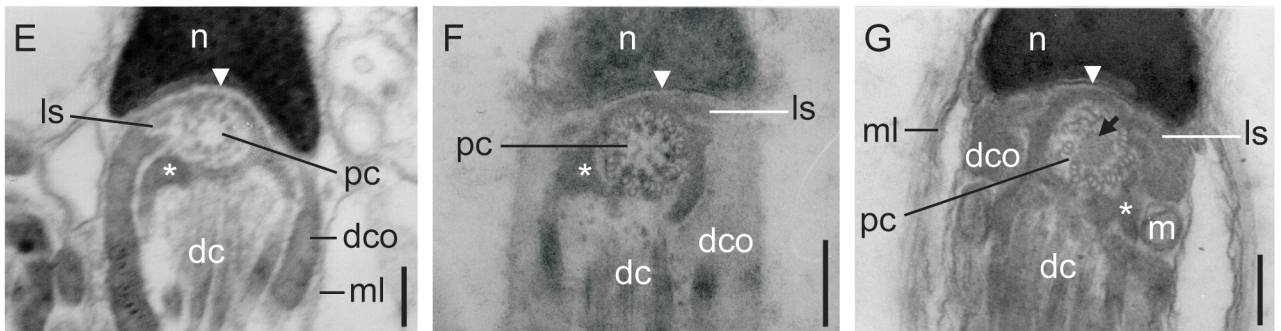
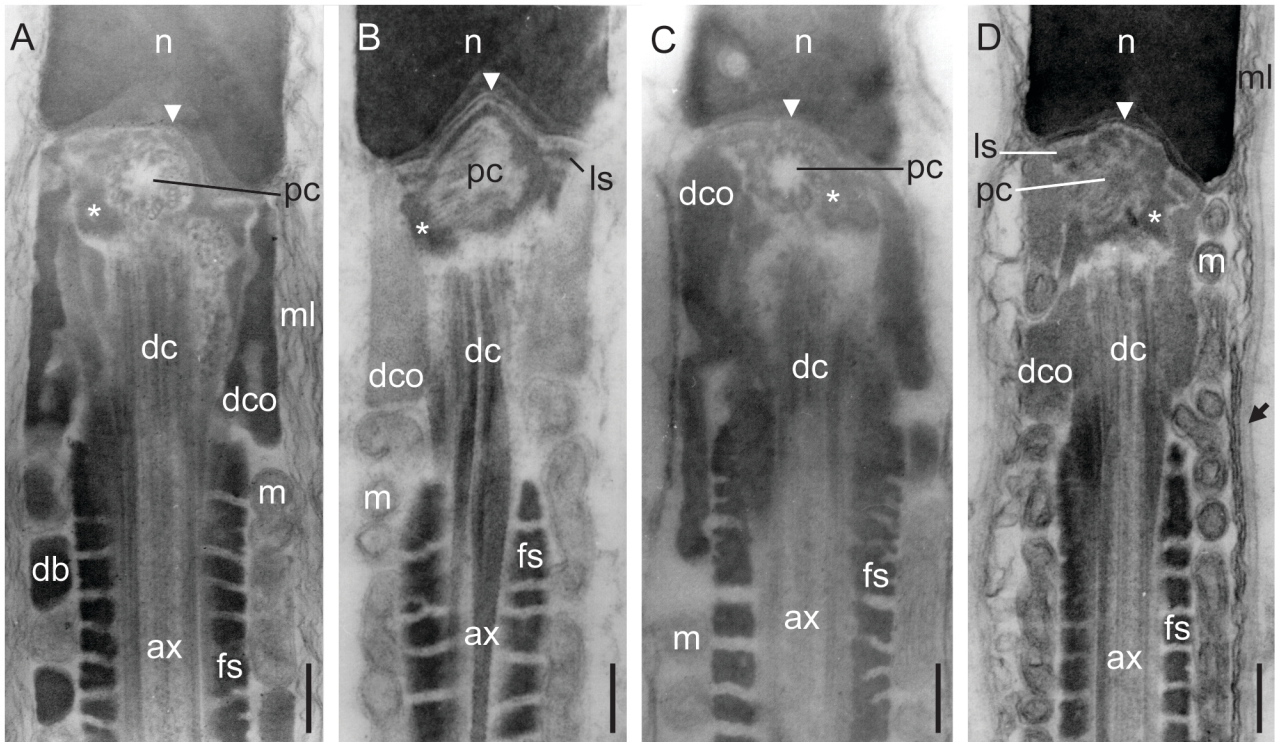
A árvore de consenso da maioria (Fig. 8A) mostra Serpentes dividida em dois grupos, Scolecophidia e Alethinophidia. O grupo monofilético Scolecophidia é o mais basal das serpentes, e é formado por dois clados. Um formado por *Ramphotyphlops* spp. e *Typhlops* spp., resultando no monofiletismo da família Typhlopidae. Outro representado

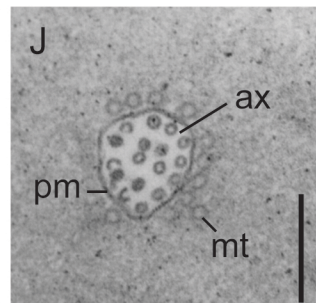
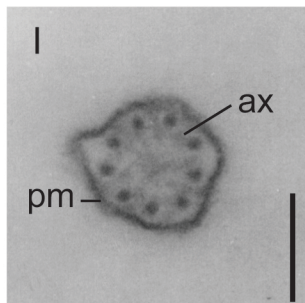
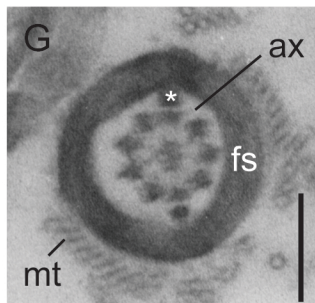
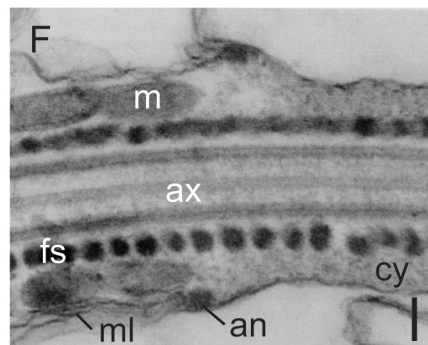
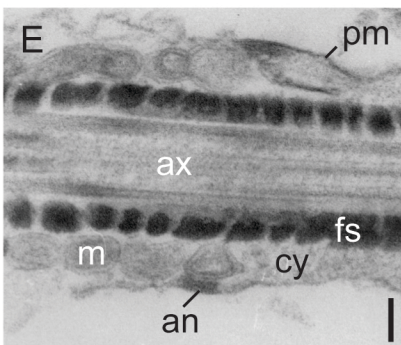
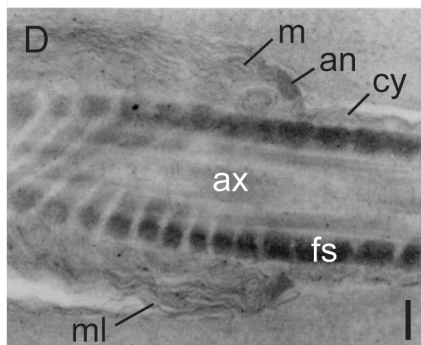
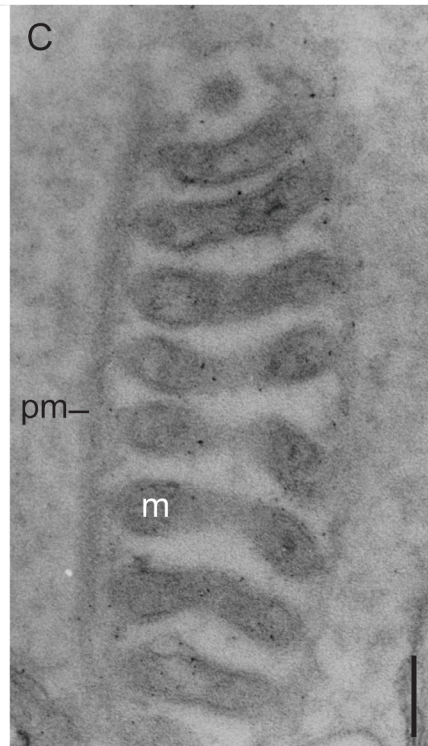
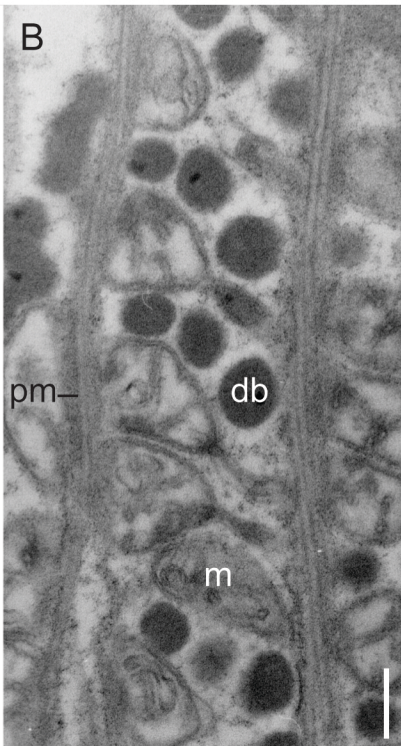
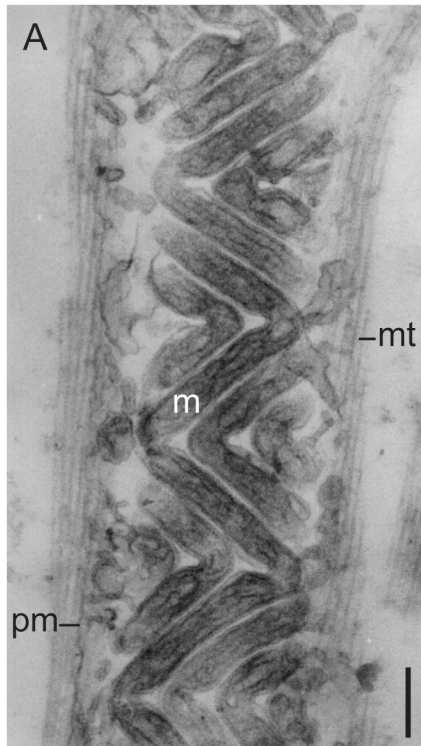
por *Leptotyphlops* spp. e *Liotyphlops* spp. *Dinilysia patagonica* aparece como táxon irmão de Alethinophidia. *Anilius scytale* e *Tropidophis* spp. formam o grupo mais basal das serpentes do grupo Alethinophidia. O segundo grupo é formado por *Cylindrophis ruffus* e *Python* spp. No próximo grupo todos os grupamentos têm posição incerta. *Oxyuranus microlepidotus* e *Boiga* spp. são mais aparentados ao clado representado por *Micrurus* spp., *Oxyrhopus* spp., e *Nerodia sipedon*. Esse grupamento é mais aparentado a *Bothrops* spp. e *Acrochordus* spp. *Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, e *Epicrates* spp. formam a família Boidae que apresentou-se monofilética, e mais aparentada a *Aspidites melanocephalus* + *Stegonotus cucullatus*. Todos esses grupamentos são mais aparentados a *Pachyrhachis problematicus*. Esse grupamento é mais aparentado a *Sibynomorphus mikanii* e *Xenopholis scalaris*.

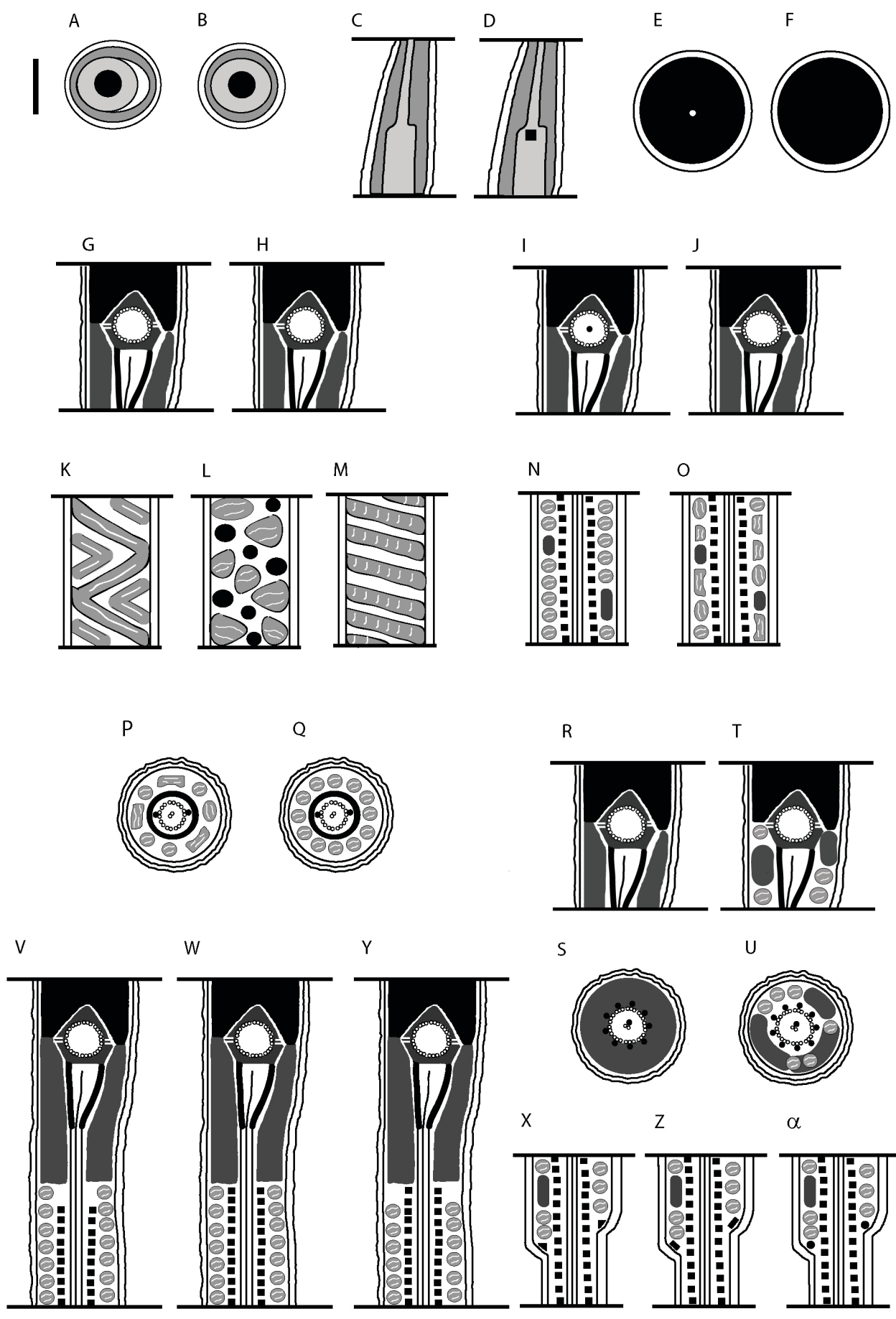
A árvore de “bootstrap” (Fig. 8B) mostra que dentro do grupo Scolecophidia os clados formados por *Ramphotyphlops* spp. e *Typhlops* spp., e *Leptotyphlops* spp. e *Liotyphlops* spp. são fracamente sustentados pelos valores de “bootstrap” de 66% e 62%, respectivamente. O grupo formado pelas serpentes do grupo Scolecophidia é altamente sustentado pelo valor “bootstrap” de 98%. A relação de parentesco do fóssil *Dinilysia patagonica* como táxon irmão de todas as serpentes do grupo Alethinophidia é moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 83%. No grupo Alethinophidia os clados formados por *Boa constrictor* e *Epicrates* spp., e por *Boiga* spp. e *Oxyuranus microlepidotus* são fracamente sustentados pelos valores “bootstrap” de 55% e 52%, respectivamente. O clado Alethinophidia (*Anilius scytale*, *Acrochordus* spp., *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis* spp., *Python* spp., *Aspidites melanocephalus*, *Corallus hortulanus*, *Micrurus* spp., *Bothrops* spp., *Sibynomorphus mikanii*, *Nerodia sipedon*, *Stegonotus cucullatus*, *Oxyrhopus* spp., *Xenopholis scalaris*, *Pachyrhachis problematicus*, *Boa constrictor*, *Epicrates* spp., *Boiga* spp., e *Oxyuranus microlepidotus*) é fracamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 60%.

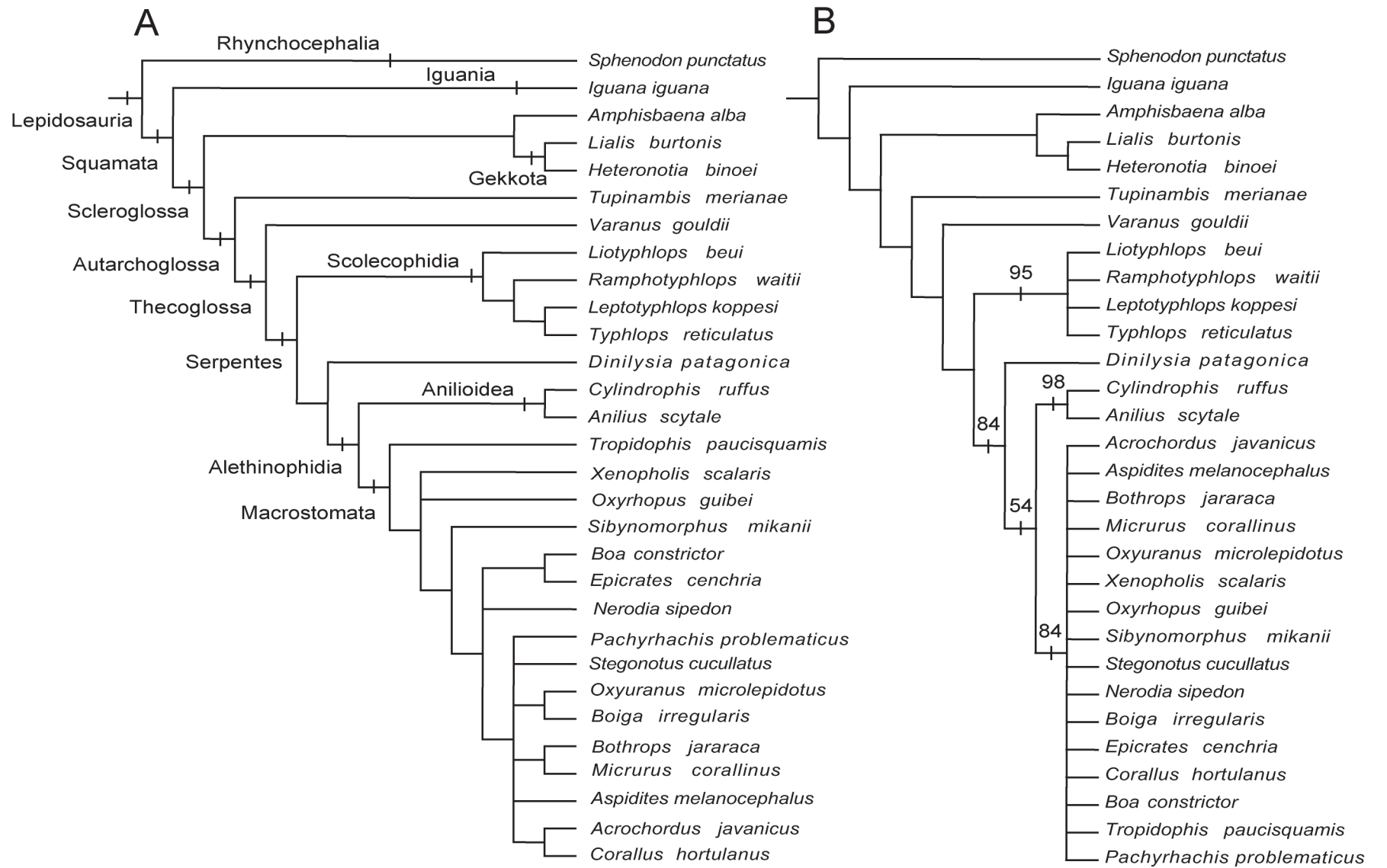


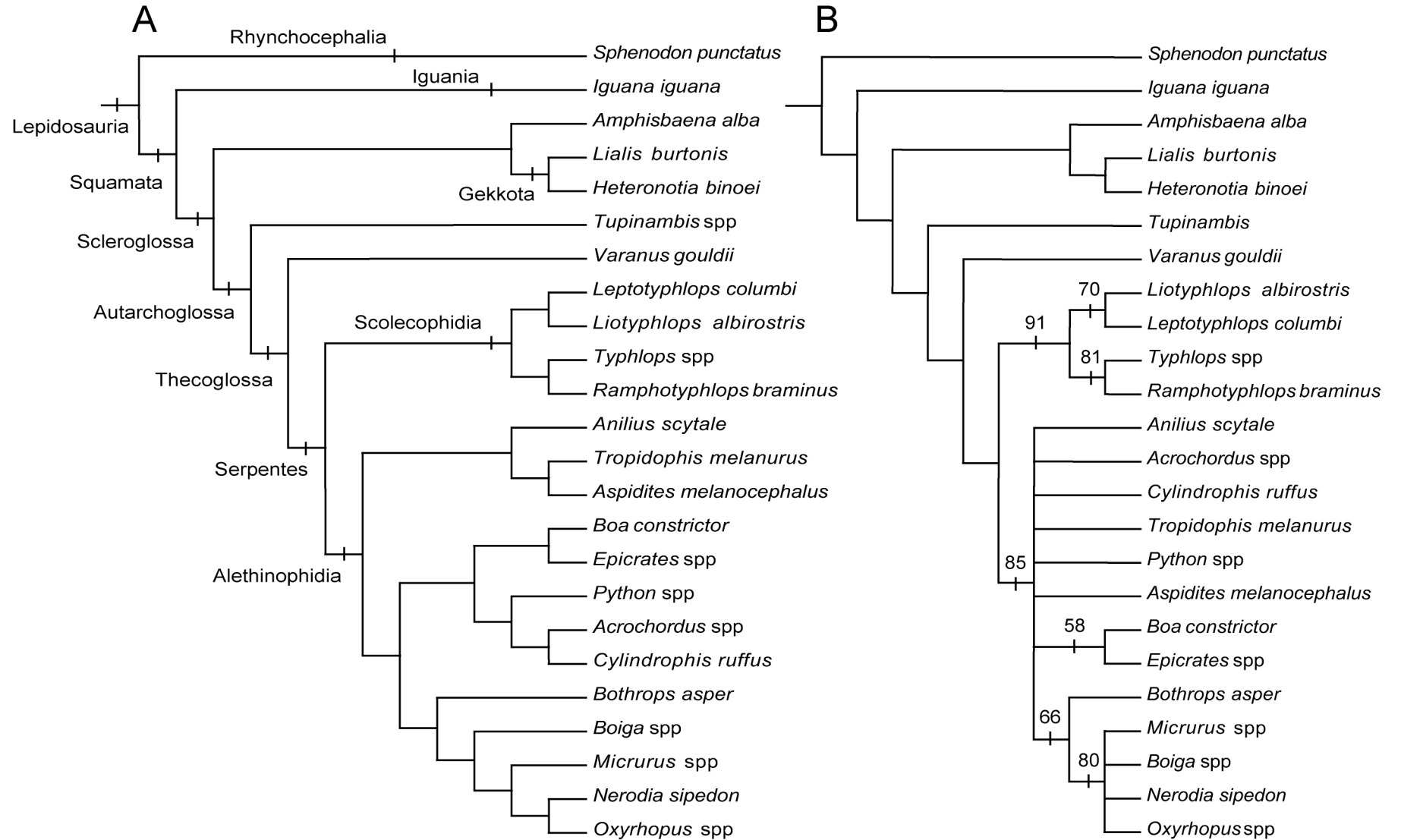


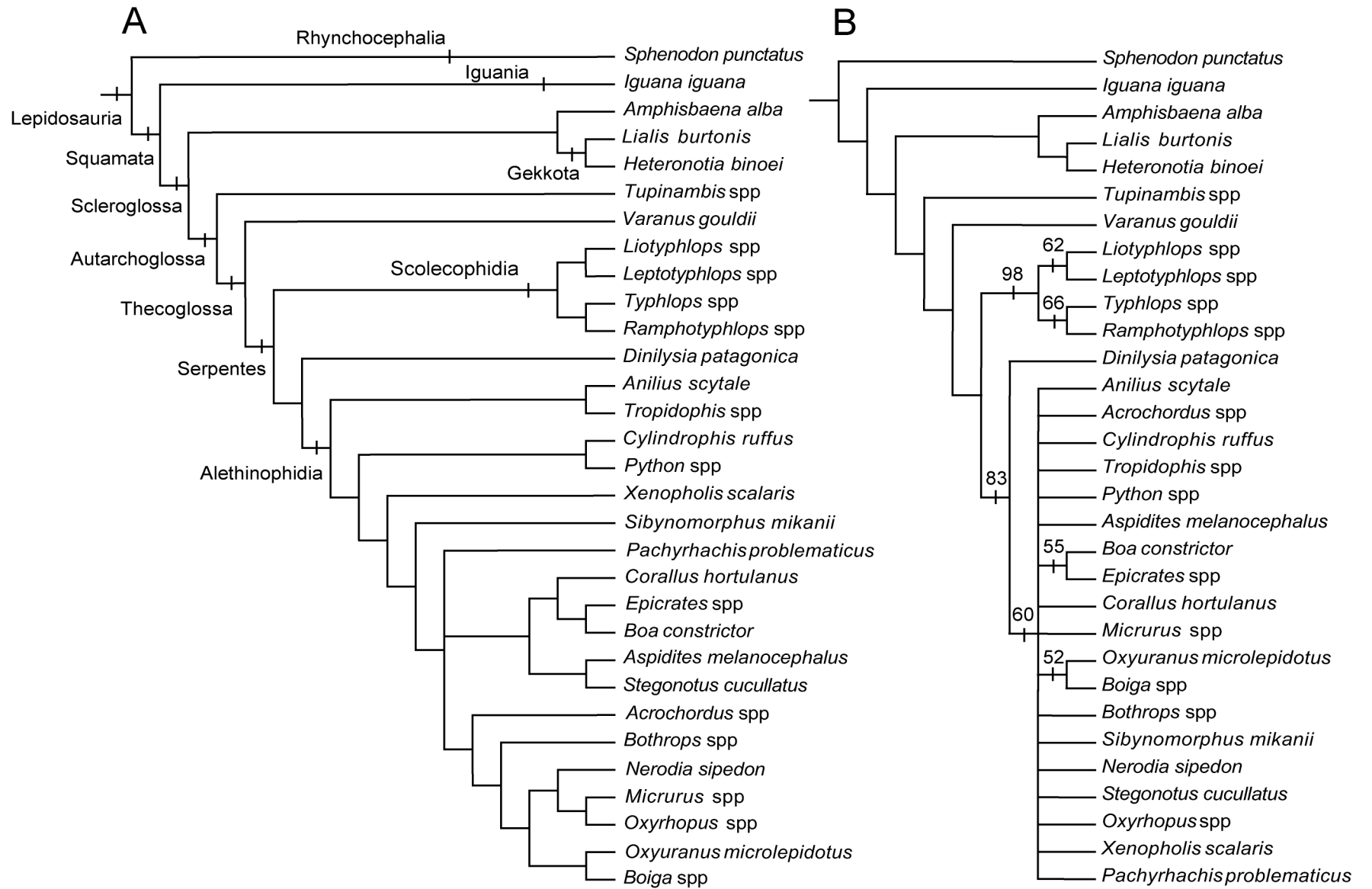












Legendas das figuras:

Figura 1. Diagrama de espermatozóide de *Bothrops jararaca*. As escalas dos componentes são aproximadas. Barra de escala: 10 µm.

Figura 2. Espermatozóide de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*. A: Micrografia de luz mostrando o espermatozóide de *S. mikanii*, com cabeça (h), peça intermediária (mp), e cauda (t). B-K: Micrografias eletrônicas de transmissão da cabeça (complexo acrossômico e núcleo) B: Corte longitudinal de complexo acrossomômico de *A. javanicus* mostrando a subdivisão da vesícula acrossômica em córtex e medula, cone subacrossomal paracristalino, perforatório, ponta do perforatório arredondada, núcleo, rostro nuclear, ombros nucleares, membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. C: Corte longitudinal do complexo acrossômico de *S. mikanii* mostrando vesícula acrossômica, cone subacrossomal paracristalino, rostro nuclear, zona epinuclear lúcida, placa basal do perforatório semelhante a um quadrado, e membranas multilaminares. D: Corte transversal da região mais anterior do complexo acrossômico *A. scytale* mostrando córtex e medula. E: Corte transversal do complexo acrossômico de *C. ruffus* mostrando vesícula acrossômica, perforatório, membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. F: Corte transversal do complexo acrossômico de *M. corallinus* mostrando a protuberância unilateral da vesícula acrossômica no nível do cone subacrossomal, zona epinuclear lúcida, membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. G: Corte transversal do complexo acrossômico de *A. javanicus* mostrando núcleo, protuberância unilateral da vesícula acrossômica no nível do cone subacrossomal, espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e cone subacrossomal (*), membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. H: Corte transversal do complexo acrossômico de *S. mikanii* mostrando a zona epinuclear lúcida, protuberância unilateral da vesícula acrossômica no nível do cone subacrossomal, e membranas multilaminares. I: Corte transversal do complexo acrossômico de *B. jararaca* mostrando núcleo, cone subacrossomal, vesícula acrossômica,

membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. J-K: Corte transversal do núcleo mostrando a presença de lacuna em *X. scalaris*, e sua ausência em *A. javanicus*, respectivamente. Note a presença de membranas multilaminares em ambas as figuras e microtúbulos extracelulares na figura K. av: vesícula acrossômica; c: córtex da vesícula acrossômica; et: zona epinuclear lúcida; h: cabeça; l: lacuna nuclear; me: medula da vesícula acrossômica; ml: membranas multilaminares; mp: peça intermediária; mt: microtúbulos extracelulares; n: núcleo; nr: rostro nuclear; ns: ombros nucleares; p: perforatóreo; pb: placa basal do perforatório; sc: cone subacrossomal; t: cauda; ur: protuberância unilateral da vesícula acrossômica. Barra de escala: 0.2 μm .

Figura 3. A-M: Micrografias eletrônicas de transmissão da região do pescoço e peça intermediária do espermatozóide de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*. A-D: Cortes transversais da peça intermediária mostrando os centríolos proximal e distal, material pericentriolar (*), colar denso, mitocôndria, bainha fibrosa, axonema, e fossa nuclear (cabeça de seta). Note a presença de membranas multilaminares nas figuras A e D, e a presença de microtúbulos extracelulares (seta) na figura D. A-C: Corte longitudinal da peça intermediária mostrando o início da bainha fibrosa na peça intermediária no nível da primeira mitocôndria em *S. mikanii*; no nível da segunda mitocôndria em *B. jararaca*; antes da primeira mitocôndria em *O. guibei*, respectivamente. Note a estrutura laminar estratificada nas figuras B e D. Note o centríolo distal circundado apenas por colar denso nas figuras A-C, e por colar denso e mitocôndrias em *A. javanicus* na figura D. E-G: Corte longitudinal da região do pescoço mostrando núcleo, centríolos proximal e distal, material pericentriolar (*), colar denso, e fossa nuclear (cabeça de seta). E: Espermatozóide de *X. scalaris* mostrando a estrutura laminar estratificada unilateral e membranas multilaminares. Note o espermatozóide de *B. jararaca* na figura F. G: Espermatozóide de *A. javanicus* mostrando a estrutura eletrondensa no centríolo proximal (seta), mitocôndria, e membranas multilaminares. H-I: Corte longitudinal da peça intermediária mostrando axonema, bainha fibrosa, e mitocôndria.

Note as mitocôndrias irregulares mitochondria e membranas multilaminares em *X. scalaris* na figura H; mitocôndria arredondada, microtúbulos extracelulares (seta), e membrana plasmática em *M. corallinus* na figura I. J-K: Corte transversal da peça intermediária mostrando o centríolo distal circundado apenas por colar denso em *C. ruffus*, r por colar denso e mitocôndrias em *A. javanicus*, respectivamente. Note as fibras periféricas (*) e membranas multilaminares em ambas as figuras, e microtúbulos extracelulares na figura K. L: Corte transversal da peça intrmediária de *B. jararaca* mostrando axonema, fibras 3 e 8 espessas (*), bainha fibrosa, mitocôndria, membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. M: Corte transversal da peça intermediária de *X. scalaris* mostrando axonema, corpos densos e mitocôndrias justapostos a bainha fibrosa, fibras 3 e 8 espessas (*), membranas multilaminares, e microtúbulos extracelulares. ax: axonems; db: corpo denso; dc: centríolo distal; dco: colar denso; fs: bainha fibrosa; ls: estrutura laminar estratificada; m: mitocôndria; ml: membranas multilaminares; mt: microtúbulos extracelulares; n: núcleo; pc: centríolo proximal; pm: membrane plasmática. A-G, I-M: barra de escala = 0.2 μm ; H: barra de escala = 0.1 μm .

Figure 4. A-J: Micrografias eletrônicas de transmissão da peça intermediária, peça principal, e peça final de *Anilius scytale*, *Cylindrophis ruffus*, *Tropidophis paucisquamis*, *Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, e *Micrurus corallinus*. A-C: Corte oblíquo da peça intermediária mostrando o arranjo de mitocôndrias como túbulos sinuosos em *A. javanicus*, arredondada em *X. scalaris*, e túbulos retos não colunares em *O. guibei*, respectivamente. Note a membrana plasmática nas figuras A-C, microtúbulos extracelulares na figura A, e corpos densos na figura B. D-F: Corte longitudinal da peça intermediária mostrando Añulos triangular em *C. ruffus*, linear em *B. jararaca*, e arredondado em *A. javanicus*, respectivamente. Note o axonema, bainha fibrosa, mitocôndria, e citoplasma nas figuras D-F, membranas multilaminares nas figuras D and F, e membrana plasmática na E. G-H: Corte transversal da região anterior e posterior da peça final, respectivamente, mostrando axonema e bainha fibrosa. Note as fibras 3 e 8 (*) e microtúbulos extracelulares em *A.*

scytale na figura G. Espermatozóide de *T. paucisquamis* está representado na figura H. I-J: Corte transversal da peça final mostrando axonema e membrana plasmática. I: Corte transversal da porção anterior da peça final de *X. scalaris* mostrando o arranjo organizado de microtúbulos do axonema. J: Corte transversal da porção posterior da peça final de *C. ruffus* mostrando o padrão de microtúbulos desorganizado. Note a presença de microtúbulos extracelulares. an: ânulos; ax: axonema; cy: citoplasma; db: corpo denso; fs: bainha fibrosa; m: mitocôndria; ml: membranas multilaminares; mt: microtúbulos extracelulares; pm: membrana plasmática. A-C, G-J: barra de escala = 0.2 μm ; D-F: barra de escala = 0.1 μm .

Figura 5. Diagrama dos caracteres polimórficos no espermatozóide de serpentes. A-D: Região do complexo acrossomal. A-B: Presença e ausência do espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e cone subacrossomal, respectivamente. C-D: Ausência da placa basal do perforatório e placa basal do perforatório semelhante a um quadrado, respectivamente. E-F: Presença e ausência da lacuna do, respectivamente. G- α : Peça intermediária. G-H: Estrutura laminar estratificada bilateral e estrutura laminar estratificada unilateral, respectivamente. I-J: Presença e ausência da estrutura eletrondensa no centríolo proximal, respectivamente. K-M: Em corte oblíquo, mitocôndrias como túbulos sinuosos, arredondadas, e túbulos retos não colunares, respectivamente. N-O: Em corte longitudinal, mitocôndrias arredondadas e irregulares, respectivamente. P-Q: Em corte transversal, mitocôndrias irregulares e arredondadas, respectivamente. R-U: Em cortes longitudinal e transversal, centríolo distal circundado apenas por colar denso e por colar denso e mitocôndrias, respectivamente. V-Y: Bainha fibrosa iniciando-se no nível da segunda mitocôndria; no nível da primeira mitocôndria; e antes da primeira mitocôndria, respectivamente. X- α : Ânulos triangular, linear, e arredondado, respectivamente. As escalas dos componentes são aproximadas. Barra de escala: 0.2 μm .

Figura 6. A. Árvore de consenso da maioria obtida na análise morfológica. B. Árvore de “bootstrap” com seus respectivos valores.

Figura 7. A. Árvore de consenso da maioria obtida na análise molecular. B. Árvore de “bootstrap” com seus respectivos valores.

Figura 8. A. Árvore de consenso da maioria obtida na análise combinada. B. Árvore de “bootstrap” com seus respectivos valores.

3.7 DISCUSSÃO

3.7.1 ESTUDO COMPARATIVO DA ULTRA-ESTRUTURA DE ESPERMATOZÓIDE EM LEPIDOSAURIA

Sinapomorfias de Squamata

Os caracteres encontrados no espermatozóide das espécies de Squamata estudadas incluem as seguintes características consideradas sinapomorfias de Squamata (Healy & Jamieson, 1994; Jamieson, 1995a, b, 1999; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996). 1) Perforatório único e pré-nuclear; 2) Ausência de canal endonuclear; 3) Presença da zona epinuclear lúcida. Sua ausência foi detectada em *Heteronotia binoei* (Gekkonidae); 4) Cone subacrossomal paracristalino. A ausência dessa estrutura sugerida em *Nerodia sipedon* (Colubridae) por Jamieson & Koehler (1994) necessita de confirmação; 5) Cristas mitocondriais lineares; 6) Presença de mitocôndria sinuosa (porém em *Oxyrhopus guibei* e *Xenopholis scalaris* (Colubridae) foram observadas mitocôndrias em túbulos retos e arredondadas, respectivamente); 7) Presença de corpos densos intermitocondriais; 8) Bainha fibrosa estendendo-se anteriormente na peça intermediária; 9) Peça intermediária com axonema, e não com o centríolo distal, formando o principal componente axial dessa região; 10) Centríolo distal curto; 11) Redução do ânulus. Ombros nucleares arredondados foi citado como uma sinapomorfia de Squamata apenas por Jamieson (1995a). Em *Lialis burtonis* (Pygopodidae) os ombros nucleares estão ausentes. Arranjo dos corpos densos intermitocondriais em anéis periódicos foi citado como uma sinapomorfia equívoca de Squamata apenas por Oliver et al. (1996), porém esse estado de caráter é de difícil acesso pois nem todos os estudos se referem e/ou apresentam essa estrutura.

Sinapomorfias de Serpentes

Embora Hamilton e Fawcett (1968) tenham sugerido que o excessivo espessamento das fibras 3 e 8 fosse uma sinapomorfia de serpentes, os resultados obtidos não confirmam essa hipótese, pois esse estado de caráter foi encontrado tanto nas serpentes, quanto nos outros grupos de Lepidosauria estudados.

Nas espécies de serpentes estudadas foram observadas as seguintes estruturas

consideradas sinapomorfias de Serpentes, listadas a seguir (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson, 1995a, 1999; Oliver et al., 1996).

1) Foi observada a redução da placa basal do perforatório em *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppersi*); Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); *Boa constrictor* e *Epicrates cenchria* (Boidae); *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae), e sua ausência em *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae); *Corallus hortulanus* (Boidae), Pythonidae (*Aspidites melanocephalus*), Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*), Viperidae (*Bothrops jararaca*), *Boiga irregularis* e *Stegonotus cucullatus* (Colubridae) e Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*). Não foi possível confirmar essa sinapomorfia em *Xenopholis scalaris* (Colubridae).

2) A redução da região da zona epinuclear lúcida foi observada em Anomalepididae (*Liotyphlops beui*); *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae); Leptotyphlopidae (*Leptotyphlops koppersi*); Aniliidae (*Anilius scytale*), Cyliodrophiidae (*Cylindrophis ruffus*); Boidae (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*); Acrochordidae (*Acrochordus javanicus*); Viperidae (*Bothrops jararaca*); Colubridae (*Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*), e Elapidae (*Oxyuranus microlepidotus*, *Micrurus corallinus*). A ausência da zona epinuclear lúcida foi observada em *Aspidites melanocephalus* (Pythonidae).

3) A presença de colar denso foi observada em todas as serpentes.

4) Foi observada a presença de membranas multilaminares em todas as serpentes estudadas. Também foi observada a presença de membranas multilaminares pouco desenvolvidas na peça intermediária do espermatozóide de *Lialis burtonis* (Pygopodidae) e de *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). Através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, foi detectada a presença de membranas multilaminares em *Dicrodon* e *Teius* (Teiidae) (Colli et al., 2007).

5) A presença de microtúbulos extracelulares foi observada em todas as serpentes estudadas. Através de observações pessoais no decorrer da revisão comparativa, a ocorrência de microtúbulos extracelulares foi observada em *Cercosaura* (Gymnophthalmidae),

Crocodylurus, *Dracaena*, *Teius*, *Dicrodon*, e *Cnemidophorus* (Teiidae) (Colli et al., 2007).

6) Peça intermediária longa. Quando comparados a espermatozoides de lagartos, a hipótese de que peça intermediária extremamente longa seja uma sinapomorfia de Serpentes foi confirmada (Tabela 4).

Os resultados corroboram as sinapomorfias propostas por Jamieson para serpentes, nos seguintes caracteres, presença de colar denso, de membranas multilaminares, e de microtúbulos extracelulares.

O arranjo das mitocôndrias em túbulos sinuosos, em corte oblíquo, foi postulado por Healy & Jamieson (1994), Jamieson (1995a, b, 1999), Harding et al. (1995) e Oliver et al. (1996) como uma sinapomorfia de Squamata, porém, tanto no mapeamento realizado no capítulo 2 (Tavares-Bastos et al., 2007b), quanto os resultados filogenéticos revelaram ser esse estado uma sinapomorfia de Serpentes.

Tabela 4. Medidas da peça intermediária em serpentes (em negrito) e lagartos.

Espécime	Peça Intermediária	Fonte
<i>Typhlops reticulatus</i>	57 µm	Este estudo
<i>Ramphotyphlops waitii</i>	108 µm	Harding et al., 1995
<i>Cylindrophis ruffus</i>	57,27 µm	Este estudo
<i>Acrochordus javanicus</i>	58,18 µm	Este estudo
<i>Bothrops jararaca</i>	27,9 µm	Este estudo
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	34 µm	Este estudo
<i>Oxyrhopus guibei</i>	70,91 µm	Este estudo
<i>Micrurus corallinus</i>	30,6 µm	Este estudo
<i>Sphenodon punctatus</i>	7 µm	Healy & Jamieson, 1994
<i>Iguana iguana</i>	3,4 µm	Vieira et al., 2004
<i>Heteronotia binoei</i>	11 µm	Jamieson, 1995a; Jamieson et al., 1996
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	3,3 µm	Tavares-Bastos et al., 2002
<i>Varanus gouldii</i>	3,1 µm	Jamieson, 1995a; Oliver et al., 1996
<i>Amphisbaena alba</i>	4,3 µm	Teixeira et al., 1999c
<i>Tropidurus torquatus</i>	2,8 µm	Teixeira et al., 1999b
<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	3,35 µm	Teixeira et al., 2002
<i>Kentropyx altamazonica</i>	7,5 µm	Teixeira et al., 2002
<i>Polychrus acutirostris</i>	7,5 µm	Teixeira et al., 1999a
<i>Micrablepharus maximiliani</i>	2,5 µm	Teixeira et al., 1999d
<i>Ameiva ameiva</i>	8 µm	Giugliano et al., 2002

Variabilidade intrafamiliar

Os resultados obtidos confirmam que caracteres polimórficos na ultra-estrutura de espermatozóide são encontrados na maioria das famílias de Squamata (Teixeira et al., 1999a, d; Giugliano et al., 2002). Sendo assim, o estudo comparativo da ultra-estrutura de espermatozóide nas espécies de Lepidosauria demonstra que a ultra-estrutura de espermatozóide promove caracteres adicionais para o entendimento das relações filogenéticas de serpentes. A variação observada na ultra-estrutura de espermatozóide nas famílias de serpentes sugere que o exame de outros gêneros e famílias de serpentes pode fornecer caracteres adicionais para o reconhecimento dos níveis de variabilidade na ultra-estrutura de espermatozóide nas diferentes categorias taxonômicas. Adicionalmente, esses estudos podem esclarecer qual o melhor nível taxonômico os caracteres derivados da ultra-estrutura de espermatozóide são mais vantajosos para inferências filogenéticas.

3.7.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os resultados concordam com a hipótese que sustenta o grupo Scolecophidia como monofilético, o mais basal das serpentes atuais, e clado irmão das outras serpentes do grupo Alethinophidia (Underwood, 1967; Rieppel, 1988b; Kluge, 1991; Cundall et al., 1993; Heise et al., 1995; Scanlon & Lee, 2000; Tchernov et al., 2000; Slowinski & Lawson, 2002; Vidal & Hedges, 2002b) com alto suporte dos valores de “bootstrap” de 95%, 91%, 98% nas análises morfológica, molecular, e combinada, respectivamente. Essa evidência corrobora a hipótese de origem fossorial das serpentes (Rieppel, 1988b; Heise et al., 1995). Estudos prévios inferidos a partir de caracteres morfológicos (Underwood, 1967; Rieppel, 1988b; Cundall et al., 1993; Scanlon & Lee, 2000; Lee & Scanlon, 2002) e moleculares (Vidal & Hedges, 2002b) indicam que Leptotyphlopidae é grupo irmão do clado formado por Anomalepididae e Typhlopidae. Entretanto, essa relação de parentesco não foi sustentada por nenhuma das análises. Porém, um melhor entendimento das relações de parentesco entre as famílias de Scolecophidia necessita de uma maior amostragem taxonômica e novos caracteres.

Nas análises, *Dinilysia patagonica* é fortemente relacionada a todos os membros

de Alethinophidia, com moderado suporte dos valores de “bootstrap” 84%, 83%. Essa evidência é sustentada pelas seguintes sinapomorfias não ambíguas compartilhadas por *D. patagonica* e Alethinophidia: rotação do quadrato (Rieppel, 1988b), pterigóide com dente, quadrato posicionado verticalmente (Tchernov et al., 2000; Apesteguía & Zaher, 2006), e palatino não contacta o ectopterigóide (Apesteguía & Zaher, 2006), dentre outras. Essa relação de parentesco concorda com a hipótese inferida a partir de caracteres morfológicos (Rieppel, 1988b; Zaher, 1998; Tchernov et al., 2000; Zaher & Rieppel, 2002; Apesteguía & Zaher, 2006), ao invés da posição basal de *D. patagonica* (Scanlon & Lee, 2000; Lee & Scanlon, 2002).

Dentro de Alethinophidia, as aletinofidianas basais (Greene, 1997) representado aqui pelo clado Anilioidea baseado em *Anilius scytale* e *Cylindrophis ruffus* foi sustentado pelas análises com alto suporte do valor de “bootstrap” de 98%. Esse clado concorda com a hipótese baseada por dados morfológicos que sustentam o monofiletismo do grupo Anilioidea, e que Anilioidea é grupo irmão dos Macrostromata (Rieppel, 1988b; Kluge, 1991; Cundall et al., 1993; Greene, 1997; Zaher, 1998; Tchernov et al., 2000; Rieppel & Zaher, 2000b; Scanlon & Lee, 2000; Zaher & Rieppel, 2002; Rieppel et al., 2002; Apesteguía & Zaher, 2006). Porém, a forte relação de parentesco entre Anilioidea e Macrostromata foi fracamente sustentada pelo valor de “bootstrap” de 54%.

As serpentes do grupo Macrostromata ingerem presas grandes graças ao desenvolvimento da terminação livre do processo posterior do supratemporal (Rieppel, 1988b), e outros caracteres são diagnósticos de Macrostromata incluindo: dentes alongado no maxilar e dentário, supratemporal cobrindo a face dorsal do proótico, processo basipterigóide reduzido com a face articulada ventral, ausência do processo suprastapedial do quadrato, e contato entre a maxila e pré-frontal móvel (Rieppel, 1988b; Zaher, 1998; Rieppel et al., 2002; Lee & Scanlon, 2002; Apesteguía & Zaher, 2006). O monofiletismo de Macrostromata é sustentado por vários estudos morfológicos (Rieppel, 1988b; Kluge, 1991; Cundall et al., 1993; Zaher, 1994, 1998; Scanlon & Lee, 2000; McDowell, 2001). O clado Macrostromata foi moderadamente sustentado pelo valor de “bootstrap” de 84%. Greene (1997) propôs que o clado Macrostromata seja formado pelos

macrostomatas basais e o grupo Caenophidia. Apesar do fato de que não foi obtida a divisão dos grupos Macrostromata e Caenophidia nas análises, foram encontrados os táxons de macrostomatas basais (*Boa constrictor*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*, *Aspidites melanocephalus*, e *Tropidophis paucisquamis*) e Caenophidia (*Acrochordus javanicus*, *Bothrops jararaca*, *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Nerodia sipedon*, *Sibynomorphus mikanii*, *Oxyrhopus guibei*, *Xenopholis scalaris*, *Micrurus corallinus*, e *Oxyuranus microlepidotus*) dentro do clado Macrostromata. Esse fato concorda com as conclusões de Cundall et al. (1993) e Rieppel (1988b) que as relações de parentesco dentro de Macrostromata continuam desconhecidas.

O fóssil *Pachyrhachis problematicus* participa da discussão crescente sobre a origem das serpentes. Nas análises, *P. problematicus* é agrupado dentro de Macrostromata e dentro de Alethinophidia. Porém essa relação de parentesco não exerce papel na discussão sobre origem das serpentes (Zaher & Rieppel, 2002; Apesteguía & Zaher, 2006). Ao invés disso, constitui o primeiro registro da incursão das serpentes macrostomatas no ambiente aquático (Tchernov et al., 2000), concordando com vários estudos inferidos por dados morfológicos (Rieppel et al., 2002; Apesteguía & Zaher, 2006), ao invés da posição basal como táxon irmão de todas as outras serpentes (Caldwell & Lee, 1997; Lee, 1998; 2000; Lee & Caldwell, 1998; Caldwell, 2000; Scanlon & Lee, 2000; Lee & Scanlon, 2002). A posição de *P. problematicus* como a serpente mais primitiva sustenta a hipótese de origem marinha das serpentes (McDowell & Bogert, 1954; Lee, 1997; Caldwell & Lee, 1997; Lee & Caldwell, 1998, 2000; Lee et al., 1999; Lee & Scanlon, 2002). Porém, as afinidades macrostomatas de *P. problematicus* não sustentam essa hipótese (Zaher, 1998; Rieppel & Zaher, 2000a; Zaher & Rieppel, 2000).

Algumas relações de parentesco dentro de Alethinophidia não foram consistentes com as relações de parentesco sugeridas por vários estudos em nenhuma das análises. Adicionalmente, nas análises os grupos Caenophidia, Colubridae, e Elapidae não foram encontrados como monofiléticos, fato esse que tem sido sugerido por vários autores (Dessauer et al., 1987; Heise et al., 1995). Hoffstetter (1955, 1962) propôs que o grupo Henophidia seja representado pelas serpentes semelhantes a boídeos, entretanto esse

grupo não apresentou-se monofilético. Esse status tem sido questionado por vários autores (Groombridge, 1979; Dessauer et al., 1987; Heise et al., 1995).

3.8) CONCLUSÃO

Os caracteres derivados da ultra-estrutura de espermatozóide podem ser bons indicadores de filogenia em nível de família, pois em termos de qualidade esses caracteres são tão bons quanto qualquer outro caráter, dado os altos níveis de homoplasia, e o fato de que esses caracteres apresentaram polimorfismo intrafamiliar, o que é vantajoso para as análises filogenéticas, sendo mais eficiente do que utilizar outros métodos de codificação ou excluir os caracteres variáveis (Wiens, 1995, 1998, 1999). Além do fato de que os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide nas espécies estudadas corroboraram tanto as sinapomorfias de Squamata (Healy & Jamieson, 1994; Jamieson, 1995a, b, 1999; Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996), quanto de Serpentes (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson, 1995a, 1999; Oliver et al., 1996), e revelaram novas sinapomorfias de Serpentes. Por tudo isso, os resultados confirmam que os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide contêm significante sinal filogenético e pode ser utilizado como um recurso adicional de caracteres para análise filogenética em serpentes (Jamieson, 1995a; Teixeira et al., 1999a, b, c, d; Vieira et al., 2005, 2007).

Ademais, estudos adicionais que descrevam a ultra-estrutura de espermatozóide em mais gêneros das famílias de serpentes são necessários para aumentar a amostragem taxonômica, e desta forma obter uma maior exatidão acerca da variabilidade na ultra-estrutura de espermatozóide nos diversos níveis taxonômicos. Esses estudos são imprescindíveis pela importância de identificar quais caracteres são mais proveitosos para as reconstruções filogenéticas, e qual o melhor nível taxonômico a ser utilizado nas inferências filogenéticas. Finalmente, aumentar o número de caracteres utilizando outros métodos de microscopia eletrônica (imunocitoquímica e citoquímica), e microscopia confocal, além de estudos sobre espermiogênese podem fornecer significante contribuição para o reconhecimento das relações de parentesco em serpentes.

VIII. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos corroboram as seguintes hipóteses:

O grupo Scolecophidia é monofilético, o mais basal das serpentes atuais, e irmão de Alethinophidia.

O grupo Alethinophidia é monofilético.

Dinilysia patagonica é irmão de Alethinophidia, e *Pachyrhachis problematicus* pertence ao grupo Alethinophidia.

Ainda, os resultados sugerem que o espermatozóide pode ser um bom indicador de filogenia, pois em termos de qualidade os caracteres da ultra-estrutura de espermatozóide são tão bons quanto qualquer outro caráter, devido aos níveis de homoplasia, ao fato de que esses caracteres corroboram as sinapomorfias inferidas a partir da ultra-estrutura de espermatozóide tanto de Squamata quanto de Serpentes, e ainda revelaram novas sinapomorfias de Serpentes. Confirmando assim que os caracteres de ultra-estrutura de espermatozóide contêm significante informação filogenética e podem ser utilizados como um recurso adicional de caracteres para reconstrução filogenética em serpentes. Porém, deve-se aumentar o número de caracteres, a amostragem taxonômica em serpentes, além de estudos filogenéticos que provavelmente solucionarão as divergências através da combinação de vários conjuntos de dados.

Enfim, acredito que a integração da biologia comparada, reconstrução filogenética, e história evolutiva podem contribuir para o entendimento das relações de parentesco em serpentes.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HAJJ, H., S. JANAKAT, & F. MAHMOUD. 1987. Eletron microscopic study of the sperm head differentiation in the lizard *Agama stellio*. Canadian Journal of Zoology. 65:2959-2968.
- ALFARO, M. E., & S. J. ARNOLD. 2001. Molecular systematics and evolution of *Regina* and the thamnophiine snakes. Molecular Phylogenetics and Evolution. 21:408-423.
- ANDERSON, W. A., & P. PERSONNE. 1973. The form and function of spermatozoa: a comparative view, p. 3-14. In: The functional anatomy of the spermatozoon. Vol. 23. B. A. Afzelius (ed.). Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney.
- APESTEGUIA, S., & H. ZAHER. 2006. A Cretaceous terrestrial snake with robust hindlimbs and a sacrum. Nature. 440:1037-1040.
- AUSTIN, C. C. 2000. Molecular phylogeny and historical biogeography of Pacific Island *Boas* (*Candoia*). Copeia. 2:341-352.
- AUSTIN, C. R. 1965. Fine structure of the snake sperm tail. Journal of Ultrastructure Research. 12:452-462.
- BACCETTI, B., & B. A. AFZELIUS. 1976. The biology of the sperm cell, Basel, New York, Karger.
- BACCETTI, B., E. BIGLIARDI, & A. G. BURRINI. 1980. The morphogenesis of vertebrate perforatorium. Journal of Ultrastructure Research. 71:272-287.
- BELLAIRS, A. D., & G. UNDERWOOD. 1951. The Origin of Snakes. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. 26:193-237.
- BOISSON, C., & X. MATTEI. 1966. La espermiogenèse de *Python sebae*, Gmelin, observée au microscope électronique. Annales de Science Naturelle, Zoologie 8:363-390.
- BROOKS, D. R., & D. A. MCLENNAN. 1991. Phylogeny, Ecology, and Behavior, a Research Program in Comparative Biology. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- BROWN, B., R. M. EMBERSON, & A. M. PATERSON. 2000. Morphological character evolution in hepialid moths (Lepidoptera: Hepialidae) from New Zealand. Biological Journal of Linnean Society. 69:383-397.
- BURBRINK, F. T. 2005. Inferring the phylogenetic position of *Boa constrictor* among the Boinae. Molecular Phylogenetics and Evolution. 34:167-180.
- BUTLER, R. D., & M. S. GABRI. 1984. Structure and development of the spearm head in the lizard *Podarcis* (=Lacerta) *taurica*. Journal of Ultrastructure Research. 88:261-274.
- CADLE, J. E. 1984a. Molecular systematics of Neotropical xenodontine snakes: I. South American xenodontines. Herpetologica. 40:8-20.
- CADLE, J. E. 1984b. Molecular systematics of Neotropical xenodontine snakes. III. Overview of xenodontine phylogeny and the history of New World snakes. Copeia. 1984:641-652.
- CADLE, J. E. 1984c. Molecular systematics of Neotropical xenodontine snakes. II. Central American xenodontines. Herpetologica. 40:21-30.
- CADLE, J. E. 1985. The Neotropical colubrid snake fauna (Serpentes: Colubridae): lineage components and biogeography. Systematic Zoology. 34:1-20.
- CADLE, J. E. 1988. Phylogenetic relationships among advanced snakes: a molecular perspective, p. 1-77. Vol. 119. University of California, Berkeley, Los Angeles, London.
- CADLE, J. E. 2001. Geographic distribution: Problems in phylogeny and zoogeography, p. 77-105. In: Snakes ecology and evolutionary biology. R. A. Seigel, J. T. Collins, & S. S. Novak (eds.), New Jersey.

- CADLE, J. E., & H. W. GREENE. 1993. Phylogenetic patterns, biogeography, and the ecological structure of Neotropical snake assemblages, p. 281-293. *In*: Species diversity in ecological communities. Historical and geographical perspectives. Vol. Chicago, London. R. E. Ricklefs & D. Schluter (eds.). The University of Chicago Press.
- CALDWELL, M. W. 1999. Description and phylogenetic relationships of a new species of *Coniasaurus* Owen, 1850 (Squamata). *Journal of Vertebrate Paleontology*. 19:438-455.
- CALDWELL, M. W. 2000. On the phylogenetic relationships of *Pachyrhachis* within snakes: A response to Zaher (1998). *Journal of Vertebrate Paleontology*. 20:187-190.
- CALDWELL, M. W., & M. S. Y. LEE. 1997. A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. *Nature*. 386:705-709.
- CAMP, C. L. 1923. Classification of the lizards. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 48:289-481.
- CARCUPINO, M., G. CORSO, & M. PALA. 1989. Spermiogenesis in *Chalcides ocellatus* tiligugu (Gmelin) (Squamata, Scincidae): an electron microscope study. *Bollettino de Zoologia*. 56:119-124.
- CLARK, A. W. 1967. Some aspects of spermiogenesis in a lizard. *American Journal of Anatomy*. 121:369-400.
- COATES, M., & M. RUTA. 2000. Nice snake, shame about the legs. *Trends in Ecology & Evolution*. 15:503-507.
- COHN, M. J., & C. TICKLE. 1999. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature*. 399:474-479.
- COLLI, G. R., R. D. TEIXEIRA, D. M. SCHELTINGA, D. O. MESQUITA, H. C. WIEDERHECKER, & S. N. BÃO. 2007. Comparative study of sperm ultrastructure of five species of teiid lizards (Teiidae, Squamata), and *Cercosaura ocellata* (Gymnophthalmidae, Squamata). *Tissue & Cell*. 39:59-78.
- COPE, E. D. 1869. On the reptilian orders Pythonomorpha and Streptosauria. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*. 12:250-266.
- COURTENS, J. L., & A. DEPEIGES. 1985. Spermiogenesis of *Lacerta vivipara*. *Journal of Ultrastructural Research*. 90:203-220.
- CUNDALL, D., V. WALLACH, & D. A. ROSSMAN. 1993. The systematic relationships of the snake genus *Anomochilus*. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 109:275-299.
- DESSAUER, H. C., J. E. CADLE, & R. LAWSON. 1987. Patterns of snake evolution suggested by their proteins. *Fieldiana: Zoology*. 34:1-34.
- DONNELLAN, S. C., M. N. HUTDRINSON, & K. M. SAINT. 1999. Molecular evidence for the phylogeny of Australian gekkonoid lizards. *Biological Journal of the Linnean Society of London*. 67:97-118.
- ESTES, R., K. DE QUEIROZ, & J. GAUTHIER. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata, p. 119-281. *In*: Phylogenetic relationships of the lizard families. Essays commemorating Charles L. Camp. R. Estes & G. Pregill (eds.). Stanford University Press.
- FAWCETT, D. W. A. 1970. Comparative view of sperm ultrastructure. *Biological Reproduction*. 2:90-127.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Biology*. 34:152-161.
- FERRAREZZI, H. 1994. Uma sinopse dos gêneros e classificação das Serpentes (Squamata): II. Family Colubridae, p. 81-91. *In*: Herpetologia do Brasil 1. F. B. e. F. E. Dias.

- (ed.), Belo Horizonte
- FITCH, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*. 20:406-416.
- FORSTNER, M. R. J., S. K. DAVIS, & E. ARÉVALO. 1995. Support for the hypothesis of anguimorph ancestry for the suborder Serpentes from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 4:93-102.
- FREEMAN, S., & J. C. HERRON. 1998. *Evolutionary Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- FULLER, S., P. BAVERSTOCK, & D. KING. 1998. Biogeographic origins of goannas (Varanidae): a molecular perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9:294-307.
- FURIERI, P. 1970. Sperm morphology of some reptiles: Squamata and Chelonia, p115-131. *In: Comparative Spermatology*. Baccetti, B. Accademia Nazionale dei Lincei
- FURIERI, P. 1974. Sperm e spermatogenesi in alcuni iguanidi Argentini. *Rivista di Biologia*. 67:233-279.
- FUTUYMA, D. G. 2003. *Biologia Evolutiva*. FUMPEC- RP Ribeirão Preto.
- GIUGLIANO, L. G., R. D. TEIXEIRA, G. R. COLLI, & S. N. BÃO. 2002. Ultrastructure of spermatozoa of lizard *Ameiva ameiva*, with considerations on polymorphism within the family Teiidae (Squamata). *Journal of Morphology*. 253:264-271.
- GREENE, H. W. 1997. *Snakes: the Evolution of Mystery in Nature*, Berkeley, Los Angeles, London.
- GREENE, H. W., & D. CUNDALL. 2000. Limbless tetrapods and snakes with legs. *Science*. 287:1939-1941.
- GROOMBRIDGE, B. C. 1979. A previously unreported throat muscle in Scolecophidia (Reptilia: Serpentes), with comments on other scolecophidian throat muscles. *Journal of Natural History*. 13:661-680.
- HAAS, G. 1979. On a new snakelike reptile from the Lower Cenomanian of Ein Jabrud, near Jerusalem. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle (Ser. 4)*. 1:51-64.
- HAAS, G. 1980. *Pachyrhachis problematicus* Haas, snakelike reptile from the Lower Cenomanian: ventral view of the skull. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle (Ser. 4)*. 2:87-104.
- HAMILTON, D. W., & D. W. FAWCETT. 1968. Unusual features of the neck and middle-piece of snake spermatozoa. *Journal Ultrastructure Research*. 23:81-97.
- HARDING, H. R., K. P. APLIN, & M. MAZUR. 1995. Ultrastructure of spermatozoa of Australian blindsnakes, *Ramphotyphlops* spp (Typhlopidae, Squamata): First observations on mature spermatozoon of Scolecophidian snakes. , p. 385-396. *In: Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. B. G. M. Jamieson, J. Ausio, & J. Justine (eds.). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- HARRIS, D. J., E. A. SINCLAIR, N. L. MERCADER, J. C. MARSHALL, & K. A. CRANDALL. 1999. Squamate relationships based on C-mos nuclear DNA sequence. *Herpetology Journal*. 9:147-151.
- HARVEY, P. H., & M. D. PAGEL. 1991. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- HEALY, J. M., & B. G. JAMIESON. 1994. The ultrastructure of spermatogenesis and epididymal spermatozoa of the tuatara *Sphenodon punctatus* (Sphenodontida, Amniota). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 344:187-199.
- HEDGES, S. B. 1994. Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the National Academy of the Sciences*. 91:2621-2624.

- HEDGES, S. B., L. E. BRAHMAKULAM, & R. THOMAS. Unpublished. Cryptic species of tropical snakes.
- HEDGES, S. B., & L. L. POLING. 1999. A molecular phylogeny of reptiles. *Science*. 283:998-1001.
- HEISE, P. J., L. R. MAXSON, H. G. DOWLING, & S. B. HEDGES. 1995. Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S r RNA and 16S rRNA genes. *Molecular Biology and Evolution*. 12:259-265.
- HILLIS, D. M., & J. J. BULL. 1993. An empirical-test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42:182-192.
- HOFFSTETTER, R. 1955. Squamates de type moderne, p. 606-662. *In: Traité de paléontologie*. Vol. 5. J. Piveteau (ed.), Masson, Paris.
- HOFFSTETTER, R. 1962. Revue des récentes acquisitions concernant l'histoire et la systématique des squamates. *Colloques internationaux du Centre national de la Recherche scientifique*. 104:243-273.
- HOWER, L. M., & S. B. HEDGES. 2003. Molecular phylogeny and biogeography of west indian teiid lizards of the genus *Ameiva* Caribbean Journal of Science. 39.
- JAMIESON, B. G. M. 1995a. The ultrastructure of spermatozoa of the Squamata (Reptilia) with phylogenetic considerations, p. 359-383. *In: Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. B. G. M. Jamieson, J. Ausio, & J. Justine (eds.). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- JAMIESON, B. G. M. 1995b. Evolution of tetrapod spermatozoa with particular reference to Amniotes, p. 343-358. *In: Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. B. G. M. Jamieson, J. Ausio, & J. Justine (eds.). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- JAMIESON, B. G. M. 1999. Spermatozoal phylogeny of the vertebrata, p. 303-331. *In: The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. C. Gagnon (ed.). Cache River Press, Vienna, Illinois.
- JAMIESON, B. G. M., & L. KOEHLER. 1994. The ultrastructure of spermatozoon of northern water snake, *Nerodia sipedon* (Colubridae, Serpentes), with phylogenetic considerations. *Canadian Journal of Zoology*. 72:1648-1652.
- JAMIESON, B. G. M., S. C. OLIVER, & D. M. SCHELTINGA. 1996. The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. I. Scincidae, Gekkonidae and Pygopodidae (Reptilia). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 77:85-100.
- JAMIESON, B. G. M., & D. M. SCHELTINGA. 1993. The ultrastructure of spermatozoa of *Nangura spinosa* (Scincidae, Reptilia). *Memoirs of Queensland Museum*. 34:169-179.
- JAMIESON, B. G. M., & D. M. SCHELTINGA. 1994. The ultrastructure of spermatozoa of the australian skinks *Ctenotus taeniolatus*, *Carlia pectoralis* and *Tiliqua scincoides scincoides* (Scincidae, Reptilia). *Memoirs of the Queensland museum*. 37:181-193.
- JENNINGS, W. B., E. R. PIANKA, & S. C. DONNELLAN. 2003. Systematics of the lizards family pygopodidae with implications for the diversification of Australian temperate biotas. *Systematic Biology*. 52:757-780.
- JING, K., K. ZHOU, & X. SHEN. Não publicado. Phylogeny of snakes based on the partial c-mos sequences.
- KEARNEY, M., & B. L. STUART. 2004. Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*. 271:1677-1683.
- KELLY, C. M. R., N. P. BARKER, & M. H. VILLET. 2003. Phylogenetics of advanced snakes

- (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. *Systematic Biology*. 52:439-459.
- KITCHING, I. J., P. L. FOREY, C. J. HUMPHRIES, & D. M. WILLIAMS. 1998. *Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis*. Oxford, Oxford University Press, New York.
- KLUGE, A. G. 1989. A Concern for Evidence and a Phylogenetic Hypothesis of Relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*. 38:7-25.
- KLUGE, A. G. 1991. Boine snake phylogeny and research cycles. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology* 178:1-58.
- KLUGE, A. G. 1993a. *Aspidites* and the phylogeny of pythonine snakes. *Records of the Australian Museum*. 19:1-77.
- KLUGE, A. G. 1993b. *Calabaria* and the phylogeny of erycine snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 107:293-351.
- LAWSON, R., J. B. SLOWINSKI, B. I. CROTHER, & F. T. BURBRINK. 2005. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37:581-601.
- LEE, M. S. Y. 1997. The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 352:53-91.
- LEE, M. S. Y. 1998. Convergent evolution and character correlation in burrowing reptiles: Towards a resolution of squamate relationships. *Biological Journal of the Linnean Society*. 65:369-453.
- LEE, M. S. Y. 2000. Soft anatomy, diffuse homoplasy, and the relationships of lizards and snakes. *Zoologica Scripta*. 29:101-130.
- LEE, M. S. Y. 2005. Choosing reference taxa in phylogenetic nomenclature. *Zoologica Scripta*. 34:329-331.
- LEE, M. S. Y., G. L. J. BELL, & M. W. CALDWELL. 1999. The origin of snake feeding. *Nature* 400:655-659.
- LEE, M. S. Y., & M. W. CALDWELL. 1998. Anatomy and relationships of *Pachyrhachis problematicus*, a primitive snake with hindlimbs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 353:1521-1552.
- LEE, M. S. Y., & M. W. CALDWELL. 2000. *Adriosaurus* and the affinities of mosasaurus, dolichosaurus, and snakes. *Journal of Paleontology*. 74:915-937.
- LEE, M. S. Y., & J. D. SCANLON. 2002. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. *Biological Reviews*. 77:333-401.
- MADDISON, W. P., & D. R. MADDISON. 2001. *MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- MCCRACKEN, K. G., J. HARSHMAN, D. A. MCCLELLAN, & A. D. AFTON. 1999. Data set incongruence and correlated character evolution: an example of functional convergence in the hind-limbs of stiftail diving ducks. *Systematic Biology*. 48:683-714.
- MCDOWELL, S. B. 1974. A catalogue of the snakes of New Guinea and the Solomons, with special reference to those in the Bernice P. Bishop Museum. Part I. Scolecophidia. *Journal of Herpetology*. 8:1-57.
- MCDOWELL, S. B. 1975. A catalogue of the snakes of New Guinea and the Solomons, with special reference to those in the Bernice P. Bishop Museum. Part II. Anilioidea and Pythoninae. *Journal of Herpetology*. 9:1-79.
- MCDOWELL, S. B. 1979. A catalogue of the snakes of New Guinea and the Solomons, with special reference to those in the Bernice P. Bishop Museum. III. Boinae and Acrochordoidea (Reptilia, Serpentes). *Journal of Herpetology*. 13:1-92.

- McDOWELL, S. B. 2001. Systematics, p. 3-50. *In*: Snakes Ecology and Evolutionary Biology. R. A. Seigel, J. T. Collins, & S. S. Novak (eds.), New Jersey.
- McDOWELL, S. B., & C. M. BORGERT. 1954. The systematic position of *Lanthanotus* and the affinities of the anguimorphan lizards. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 105:1-154.
- McLENNAN, D. A. 1994. A phylogenetic approach to the evolution fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4:430-460.
- MILLER, H. C. Unpublished. Cloacal and buccal swabs are a reliable source of DNA for microsatellite genotyping of reptiles.
- NEWTON, W. D., & S. E. TRAUTH. 1992. Ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Cnemidophorus sexlineatus* (Sauria: Teiidae). *Herpetologica*. 48:330-343.
- NOONAN, B. P., & P. T. CHIPPINDALE. 2006. Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of booid lizards. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:347-358.
- NOPCSA, F. 1923. *Eidolosaurus* und *pachyophis*. Zwei neue Neocom-Reptilien. *Palaeontographica*. 65:99-154.
- NOTREDAME, C., & C. ABERGEL. 2003. Using multiple alignment methods to assess the quality of genomic data analysis, in bioinformatics and genomes: Current Perspectives. M. Andrade (ed.). Horizon Scientific Press.
- OKIA, N. O. 1990. The ultrastructure of the developing sperm tail middle piece in the skink *Eumeces laticeps* (Lacertilia: Scincidae). *Proceedings of the XIIth International Congress for Electron Microscopy- Electron Microscopy*. 3:84-85.
- OLIVER, S. C., B. G. M. JAMIESON, & D. M. SCHELTINGA. 1996. The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). *Herpetologica*. 52:216-241.
- OTA, H., M. HONDA, M. KOBAYASHI, S. SENGOKU, & T. HIKIDA. Unpublished. Phylogenetic relationships of the eublepharid geckos (Reptilia: Squamata): A molecular approach.
- PAGEL, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*. 401:877-884.
- PARKINGSON, C. L. 1999. Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia*. 3:576-586.
- PIANKA, E. R., & L. J. VITT. 2003. *Lizards: windows to the evolution of diversity*. University of California Press, Berkeley.
- PINO, T., S. VICARIO, M. MARSCHNER, & A. CACCONE. 2004. Relict snakes of North America and their relationships within Caenophidia, using likelihood-based Bayesian methods on mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32:563-574.
- POUGH, F. H., C. M. JAMIS, & J. B. HEISER. 2003. *A vida dos vertebrados*. Atheneu Editora, São Paulo.
- POUGH, F. H., R. M. ANDREWS, J. E. CADLE, M. L. CRUMP, A. H. SAVITZKY, & D. K. WELLS. 2004. *Herpetology*. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- RAGE, J. C. 1982. The phylogeny of the Lepidosauria (Reptilia) - a cladistic approach. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*. 294:399-402.
- RAWLINGS, L. H., J. WHITTIER, R. T. MASON, & S. C. DONNELLAN. Unpublished. Origin of Guam's feral brown tree snakes (*Boiga irregularis*) inferred from molecular genetic markers.
- RIEPEL, O. 1979. The evolution of the basicranium in the Henophidia (Reptilia: Serpentes).

- Zoological Journal of the Linnean Society. 66:411-431.
- RIEPEL, O. 1988a. The classification of Squamata. *In: The phylogeny and classification of tetrapods: amphibians, reptiles, birds.* . Vol. 1. M. J. Benton (ed.). Oxford: Clarendon Press, New York.
- RIEPEL, O. 1988b. A review of the origin of snakes. *Evolutionary Biology.* 22:37-130.
- RIEPEL, O., & H. ZAHER. 2000a. The intramandibular joint in squamates, and the phylogenetic relationships of the fossil snake *Pachyrhachis problematicus* Haas. *Fieldiana:*1-69.
- RIEPEL, O., & H. ZAHER. 2000b. The braincases of mosasaurs and *Varanus*, and the relationships of snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 129:489-514.
- RIEPEL, O., & H. ZAHER. 2001a. Re-building the bridge between mosasaurs and snakes *Neues Jahrbuch Fur Geologie Und Palaontologie-Abhandlungen.* 221:111-132.
- RIEPEL, O., & H. ZAHER. 2001b. The development of the skull in *Acrochordus granulatus* (Schneider) (Reptilia : Serpentes), with special consideration of the otico-occipital complex. *Journal of Morphology.* 249:252-266.
- RIEPEL, O., A. G. KLUGE, & H. ZAHER. 2002. Testing the phylonegetic relationships of the Pleistocene snake *Wonambi naracoortensis* Smith. *Journal of Vertebrate Paleontology.* 22:812-829.
- RIEPEL, O., H. ZAHER, E. TCHERNOV, & M. J. POLCYN. 2003. The anatomy and relationships of *Haasiophis terrasanctus*, a fossil snake with well-developed hind limbs from the Mid-Cretaceous of the Middle East. *Journal of Paleontology.* 77:536-558.
- SAINT, K. M., C. C. AUSTIN, S. C. DONNELLAN, & M. N. HUTCHINSON. 1998. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 10:259-263.
- SCANLON, J. D., & M. S. Y. LEE. 2000. The Pleistocene serpent *Wonambi* and the early evolution of snakes. *Nature.* 403:416-420.
- SCHELTINGA, D. M., B. G. M. JAMEISON, S. E. TRAUTH, & C. T. McALLISTER. 2000. Morphology of the spermatozoa of the iguanian lizards *Uta stansburiana* and *Urosaurus ornatus* (Squamata, Phrynosomatidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology.* 32:261-271.
- SCHWENK, K. 1993a. Are geckos olfactory specialists? *Journal of Zoology.* 229:289-302.
- SCHWENK, K. 1993b. The evolution of chemoreception in squamate reptiles - a phylogenetic approach. *Brain Behavior and Evolution.* 41:124-137.
- SCHWENK, K. 2000. *Feeding: form, function and evolution in tetrapod vertebrates.* Academic Press, SanDiego, CA.
- SENN, D. G., & R. G. NORTH CUT. 1973. Forebrain and midbrain of some squamates and their bearing on origin of snakes. *Journal of Morphology.* 140:135-151.
- SINERIZ, M., G. J. SCROOCCHI, & C. M. ABATE. Unpublished. Molecular biology. *Oxyrhopus rhombifer* 12S rRNA partial sequence.
- SLOWINSKI, J. B., & R. LAWSON. 2002. Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 24:194-202.
- SOWFFORD, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SOWFFORD, D. L. 2003. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- TALBOT, P. 1991. Compartmentation in the acrosome, p. 255-258. *In: Comparative spermatology 20 years after.* Vol. 75. B. Baccetti (ed.). Raven Press, New York.
- TAVARES-BASTOS, L., R. D. TEIXEIRA, G. R. COLLI, & S. N. BÃO. 2002. Polymorphism in the sperm ultrastructure among four species of lizards in the genus *Tupinambis*

- (Squamata: Teiidae). *Acta Zoologica* (Stockholm). 83:297-307.
- TAVARES-BASTOS, L., L. CUNHA, G. R. COLLI, & S. N. BÁO. 2007a. Ultrastructure of spermatozoa of scolecophidian snakes (Lepidosauria, Squamata). *Acta Zoologica* (Stockholm). 88: 189-197.
- TAVARES-BASTOS, L., G. R. COLLI, & S. N. BÁO. 2007b. The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes). *Zoomorphology*. in press.
- TCHERNOV, E., O. RIEPPEL, H. ZAHER, M. J. POLCYN, & L. L. JACOBS. 2000. A fossil snake with limbs. *Science*. 287:2010-2012.
- TEIXEIRA, R. D., G. R. COLLI, & S. N. BÁO. 1999a. The ultrastructure of the spermatozoa of the worm-lizard *Amphisbaena alba* (Squamata, Amphisbaenidae), and the phylogenetic relationships of amphisbaenians. *Canadian Journal of Zoology*. 77:1254-1264.
- TEIXEIRA, R. D., G. R. COLLI, & S. N. BAO. 1999b. The ultrastructure of the spermatozoa of the lizard *Micrablepharus maximiliani* (Squamata, Gymnophthalmidae), with considerations on use of sperm ultrastructure characters in phylogenetic reconstruction. *Acta Zoologica* (Stockholm). 80:47-59.
- TEIXEIRA, R. D., G. R. COLLI, & S. N. BÁO. 1999c. The ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Polychrus acutirostris* (Squamata, Polychrotidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 31:387-395.
- TEIXEIRA, R. D., G. H. C. VIEIRA, G. R. COLLI, & S. N. BÁO. 1999d. Ultrastructural study of spermatozoa of the lizards, *Tropidurus semitaeniatus* and *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae). *Tissue & Cell*. 31:308-317.
- TEIXEIRA, R. D., D. M. SCHELTINGA, S. E. TRAUTH, G. R. COLLI, & S. N. BÁO. 2002. A comparative ultrastructural study of spermatozoa of the teiid lizards, *Cnemidophorus gularis gularis*, *Cnemidophorus ocellifer*, and *Kentropyx altamazonica* (Reptilia, Squamata, Teiidae). *Tissue & Cell*. 34:135-142.
- TONG, Z., Y. WANG, K. ZHOU, & X. WU. Unpublished. The evolutionary relationships of 34 species of snakes based on 12S rRNA gene sequences.
- TOURMENTE, M., G. CARDOZO, M. BERTONA, A. GUIDOBALDI, L. GIOJALAS, & M. CHIARAVIGLIO. 2006. The ultrastructure of the spermatozoa of *Boa constrictor occidentalis*, with considerations on its mating system and sperm competition theories. *Acta Zoologica* (Stockholm). 87:25-32.
- TOWNSEND, T. M., A. LARSON, E. LOUIS, & R. MACEY. 2004. Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the Squamata tree. *Systematic Biology*. 53:735-757.
- UETZ, P., T. ETZOLD, & R. CHENNA. 2007. The EMBL Reptile Database. <http://www.embl-heidelberg.de/~uetz/LivingReptiles.html>.
- UNDERWOOD, G. 1967. A contribution to the classification of snakes. *British Museum Natural History*. 653:1-179.
- VENCES, M., F. GLAW, J. KOSUCH, W. BOEHME, & M. VEITH. 2001. Phylogeny of South American and Malagasy boine snakes: molecular evidence for the validity of *Sanzinia* and *Acrantophis* and biogeographic implications. *Copeia*. 4:1151-1154.
- VIDAL, N., S. G. KINDL, A. WONG, & S. B. HEDGES. 2000. Phylogenetic relationships of xenodontine snakes inferred from 12S and 16S ribosomal RNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14:389-402.
- VIDAL, N., & S. B. HEDGES. 2002a. Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. *Comptes Rendus Biologies*. 325:987-995.
- VIDAL, N., & S. B. HEDGES. 2002b. Higher-level relationships of snakes inferred from four

- nuclear and mitochondrial genes. *Comptes Rendus Biologies*. 325:977-985.
- VIDAL, N., & S. B. HEDGES. 2004. Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 271: S226-S229.
- VIDAL, N., & S. B. HEDGES. 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies*. 328:1000-1008.
- VIEIRA, G. H. C., G. R. COLLI, & S. N. BAO. 2004. The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Iguana iguana* (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. *Journal of Anatomy*. 204:451-464.
- VIEIRA, G. H. C., G. R. COLLI, & S. N. BAO. 2005. Phylogenetic relationships of corytophanid lizards (Iguania, Squamata, Reptilia) based on partitioned and total evidence analyses of sperm morphology, gross morphology, and DNA data. *Zoologica Scripta*. 34:605-625.
- VIEIRA, G. H. C., L. D. CUNHA, D. SCHELTINGA, F. GLAW, G. R. COLLI, & S. N. BAO. 2007. Sperm ultrastructure of hoplocercid and oplurid lizards (Sauropsida, Squamata, Iguania) and the phylogeny of Iguania. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 45 (3): 230-241.
- VITT, L. J., E. R. PIANKA, W. E. COOPER, & K. SCHWENK. 2003. History and the global ecology of squamate reptiles. *American Naturalist*. 162:44-60.
- VITT, L. J., & E. R. PIANKA. 2005. Deep history impacts present-day ecology and biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:7877-7881.
- WALLS, G. L. 1940. Ophthalmological implications for the early history of the snakes. *Copeia*. 1940:1-8.
- WHITING, A. S., A. M. BAUER, & J. W. SITES. 2003. Phylogenetic relationships and limb loss sub-Saharan African scincine lizards (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29:582-598.
- WIENS, J. J. 1995. Polymorphic characters in phylogenetic systematics. *Systematic Biology*. 44:482-500.
- WIENS, J. J. 1998. Testing phylogenetic methods with tree congruence: phylogenetic analysis of polymorphic morphological characters in phrynosomatid lizards. *Systematic Biology*. 47:427-444.
- WIENS, J. J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 30:327-362.
- WILCOX, T. P., D. J. ZWICKL, T. A. HEATH, & D. M. HILLIS. 2002. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25:361-371.
- WU, X. C., D. B. BRINKMAN, & A. P. RUSSELL. 1996. *Sineoamphisbaena hexatabularis*, an amphisbaenian (Diapsida: Squamata) from the Upper Cretaceous redbeds at Bayan Mandahu (Inner Mongolia, People's Republic of China), and comments on the phylogenetic relationships of the Amphisbaenia. *Canadian Journal of Earth Sciences*. 33:541-577.
- ZAHER, H. 1994. Les Tropidopheoidea (Serpentes; Alethinophidia) sont-ils réellement monophylétiques? Arguments en faveur de leur polyphylétisme. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie (Paris)*. 317:471-478.
- ZAHER, H. 1998. The phylogenetic position of *Pachyrhachis* within snakes (Squamata, Lepidosauria). *Journal of Vertebrate Paleontology*. 18:1-3.
- ZAHER, H. 1999. Hemipenial morphology of the South American xenodontine snakes,

- with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*:1-168.
- ZAHER, H., & O. RIEPPEL. 1999a. Tooth implantation and replacement in squamates, with special reference to mosasaur lizards and snakes. *American Museum Novitates*:1-19.
- ZAHER, H., & O. RIEPPEL. 1999b. The phylogenetic relationships of *Pachyrhachis problematicus*, and the evolution of limblessness in snakes (Lepidosauria, Squamata). *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule a-Sciences De La Terre Et Des Planetes*. 329:831-837.
- ZAHER, H., & O. RIEPPEL. 2000. A brief history of snakes. *Herpetological Review*. 31:73-76.
- ZAHER, H., & O. RIEPPEL. 2002. On the phylogenetic relationships of the Cretaceous snakes with legs, with special reference to *Pachyrhachis problematicus* (Squamata, Serpentes). *Journal of Vertebrate Paleontology*. 22:104-109.
- ZUG, G. R., L. J. VITT, & J. P. CALDWELL. 2001. *Herpetology. An introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, San Diego, CA.

X. ANEXOS

Anexo I: “Ultrastructure of spermatozoa of scolecophidian snakes (Lepidosauria, Squamata)” *Acta Zoologica (Stockholm)*. 88: 189-197.

Anexo II: “The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes)”.
Zoomorphology. in press.

Anexo III: Lista de caracteres e seus estados.

Anexo IV: Matriz de dados.

Anexo I

Artigo publicado no periódico Acta Zoológica (Stockholm)

L. Tavares-Bastos; L. Cunha; G. R. Colli & S. N. Bão.

Ultrastructure of spermatozoa of scolecophidian snakes (Lepidosauria, Squamata). *Acta Zoologica* (Stockholm). 88: 189-197.

Ultrastructure of spermatozoa of scolecophidian snakes (Lepidosauria, Squamata)

L. Tavares-Bastos,¹ L. D. Cunha,² G. R. Colli³ and S. N. Báo²

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal; ²Departamento de Biologia Celular; ³Departamento de Zoologia, Universidade de Brasília, 70919–900, Brasília, DF, Brazil

Keywords:

Anomalepididae, Leptotyphlopidae, snakes, spermatozoa, Typhlopidae, ultrastructure

Accepted for publication:

1 December 2006

Abstract

Tavares-Bastos, L., Cunha, L.D., Colli, G.R. and Báo, S.N. 2007. Ultrastructure of spermatozoa of scolecophidian snakes (Lepidosauria, Squamata). — *Acta Zoologica* (Stockholm) 88: 189–197

We provide a detailed description of the sperm ultrastructure of three species of scolecophidian snakes, *Leptotyphlops koppesi* (Leptotyphlopidae), *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae) and *Liotyphlops beui* (Anomalepididae), and make comparisons with the spermatozoa of *Ramphotyphlops waitii* (Typhlopidae) (Harding *et al.* 1995). All the species studied bear synapomorphies of Squamata and Serpentes. Among scolecophidian snakes, we identified eight polymorphic characters. Previous analyses of molecular and somatic morphological data provide equivocal solutions to the relationships among Anomalepididae, Leptotyphlopidae and Typhlopidae. A close relationship between Anomalepididae and Typhlopidae is corroborated by two characters of sperm ultrastructure, presence of an electron-dense structure inside the proximal centriole and rounded mitochondria in transverse sections of *T. reticulatus*, *Li. beui* and *R. waitii*, whereas the absence of the ridge on the acrosome surface of *Le. koppesi* and *T. reticulatus* support a closer relationship between Typhlopidae and Leptotyphlopidae. The differences observed in sperm ultrastructure within Typhlopidae suggest the existence of snake intrafamilial polymorphism. The sperm characters of blindsnakes contain significant phylogenetic information and may provide important data for snake phylogenetic reconstructions.

Correspondence: Leonora Tavares-Bastos, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70919–970, Brasília, DF, Brazil. E-mail: leonora@unb.br

Introduction

Snakes are divided into two major groups, Scolecophidia (blindsnakes) and Alethinophidia (typical snakes) (Cundall *et al.* 1993; Heise *et al.* 1995; Zaher 1998; Zaher and Rieppel 1999; Lee and Scanlon 2002; Vidal and Hedges 2002a,b, 2004). Scolecophidians retain many ancestral characteristics, associated with a subterranean life-style, and form a monophyletic assemblage (Rieppel 1988a; Cundall *et al.* 1993; Heise *et al.* 1995; Scanlon and Lee 2000; Tchernov *et al.* 2000; Vidal and Hedges 2002b), with three groups: Leptotyphlopidae, Typhlopidae and Anomalepididae (Underwood 1967; Groombridge 1979; Rieppel 1988a; Heise *et al.* 1995; Vidal and Hedges 2002b).

Vidal and Hedges (2002b) using sequence data (for C-mos, 12S rRNA, 16S rRNA and cytochrome b) indicated

that Leptotyphlopidae is the sister group of a clade formed by Anomalepididae and Typhlopidae. Somatic morphological data corroborated this analysis (Rieppel 1988b; Cundall *et al.* 1993; Scanlon and Lee 2000; Lee and Scanlon 2002), whereas Heise *et al.* (1995), also using sequence data (for 12S rRNA, 16S rRNA) concluded that Typhlopidae and Leptotyphlopidae are more closely related to each other than to Anomalepididae.

Scolecophidians are fossorial with a small gape size and feed exclusively on ants and termites (Greene 1997; Zug *et al.* 2001; Vidal and Hedges 2004). They occur in tropical habitats. Members of Typhlopidae are cosmopolitan in tropical regions; Leptotyphlopidae range through the tropics and subtropics of Africa and the Americas, and south-west Asia, whereas Anomalepididae show disjunct distribution in Central and South America (Zug *et al.* 2001).

The details of the ultrastructural characteristics of the spermatozoa provide information for use in phylogenetic analysis (Jamieson 1995; Oliver *et al.* 1996; Teixeira *et al.* 1999; Tavares-Bastos *et al.* 2002; Vieira *et al.* 2004). The only previous ultrastructural study concerning the spermatozoa of Scolecophidia was provided by Harding *et al.* (1995), describing the spermatozoa of *Ramphotyphlops* ssp.; thus the spermatozoa of the basal snakes are still poorly known. We here provide detailed ultrastructural descriptions of spermatozoa of *Leptotyphlops koppersi* (Leptotyphlopidae), *Typhlops reticulatus* (Typhlopidae), and *Liotyphlops beui* (Anomalepididae) and making comparisons within Scolecophidia.

Materials and Methods

We obtained epididymal spermatozoa from *Le. koppersi* (Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília, CHUNB 40750) (Leptotyphlopidae), which was collected in Luziânia, Goiás State, Brazil (16°5'S, 48°W); *T. reticulatus* (CHUNB 40659) (Typhlopidae), collected in Cachimbo, Pará State, Brazil (86°S, 55°5'W); and *Li. beui* (Coleção Herpetológica do Instituto Butantan, IB 43608) (Anomalepididae) collected in Freguesia, São Paulo State, Brazil (23°9'S, 46°7'W). Specimens of *Le. koppersi* and *T. reticulatus* were killed using Thiopental® and their epididymides were removed by dissection and diced in small pieces (1–3 mm²). Tissues were fixed for 24 h at 4 °C in a solution containing 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde and 3% sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The specimen of *Li. beui* was conserved in 10% formaldehyde so its epididymides were rehydrated in decreasing alcohol concentrations (70–30%) and rinsed in distilled water before being put through fixation. Samples were subsequently rinsed in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Next, they were dehydrated in a series of ascending concentration acetone solutions (30–100%) and embedded in Spurr's epoxy resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, then observed and photographed using a Jeol® 1011 transmission electron microscope. Light microscopic observations of spermatozoa of *T. reticulatus* from glutaraldehyde/paraformaldehyde-fixed smears were made, under Nomarski interference, using a Zeiss® Axiophot microscope.

Results

A generalized scolecophidian spermatozoon is represented diagrammatically in Fig. 1. The spermatozoa of all species present a common general design, being filiform and presenting three distinct regions: the head, which consists of the acrosome complex and the nucleus, the midpiece and the tail, differentiated in principal and end piece (Fig. 2A).

Acrosome complex

The acrosome complex covers the anterior portion of the nucleus and consists of two caps, the external acrosomal vesicle and the internal subacrosomal cone (Fig. 2B). In cross-sections, the anteriormost region appears flattened in *T. reticulatus* (Fig. 2E) and circular in *Le. koppersi* and *Li. beui* (Fig. 2F). The acrosome vesicle is divided into two slightly different portions: a more internal medulla and a thinner cortex (Fig. 2D,E–H). The difference in electron-density between these portions is almost imperceptible, although there is a clearly distinct band joining them together. Within the medulla, there is a single elongated perforatorium (Fig. 2C,D,G,H). Its tip is pointed in *T. reticulatus* (Fig. 2C) and rounded in *Le. koppersi* (Fig. 2D). It presents a stopper-like basal modification in both species, inserted into the apical portion of the subacrosomal cone, which can be distinguished by a higher electron-density (Fig. 2B). We did not obtain consistent data from longitudinal section of the perforatorium of *Li. beui*. The subacrosomal cone covers the anterior region of the nucleus, the nuclear rostrum. It has a homogeneous paracrystalline aspect in both longitudinal (Fig. 2B,K) and transverse (Fig. 2I,J) sections. A small epinuclear electron-lucent zone is observed between the tip of the rostrum and the covering subacrosomal cone (Fig. 2B,K). Only in *Li. beui* is there a distinct unilateral ridge of the acrosomal vesicle, located at the transition between the epinuclear zone and the rostrum tip (Fig. 2K,J).

Nucleus

The cylindrical nucleus is strongly electron-dense and homogeneous, which reflects the high level of compaction of the chromatin. However, an electron-lucent lacuna was observed within the nucleus (Fig. 2L). In cross-sections, the nucleus is circular (Fig. 2L), the region tapering within the subacrosomal cone being markedly narrower (Fig. 2B). At its base, the nucleus has a nuclear fossa, which accommodates some electron-dense material and part of the proximal centriole (Fig. 3A,B).

Neck region

The neck region marks the transition between the nucleus and the midpiece. It contains the proximal and distal centrioles, the pericentriolar material, and the dense collar (neck cylinder). The electron-dense and homogeneous pericentriolar material conforms in shape to the nuclear fossa, surrounding the proximal centriole, and extending posteriorly. A stratified laminar structure projects bilaterally towards the nuclear fossa (Fig. 3A). A central electron-dense structure lies within the proximal centriole in *T. reticulatus* and *Li. beui* (Fig. 3B), but is absent from *Le. koppersi* (Fig. 3A). The distal centriole forms the basal body of the axoneme and is positioned perpendicular to the proximal centriole, extending

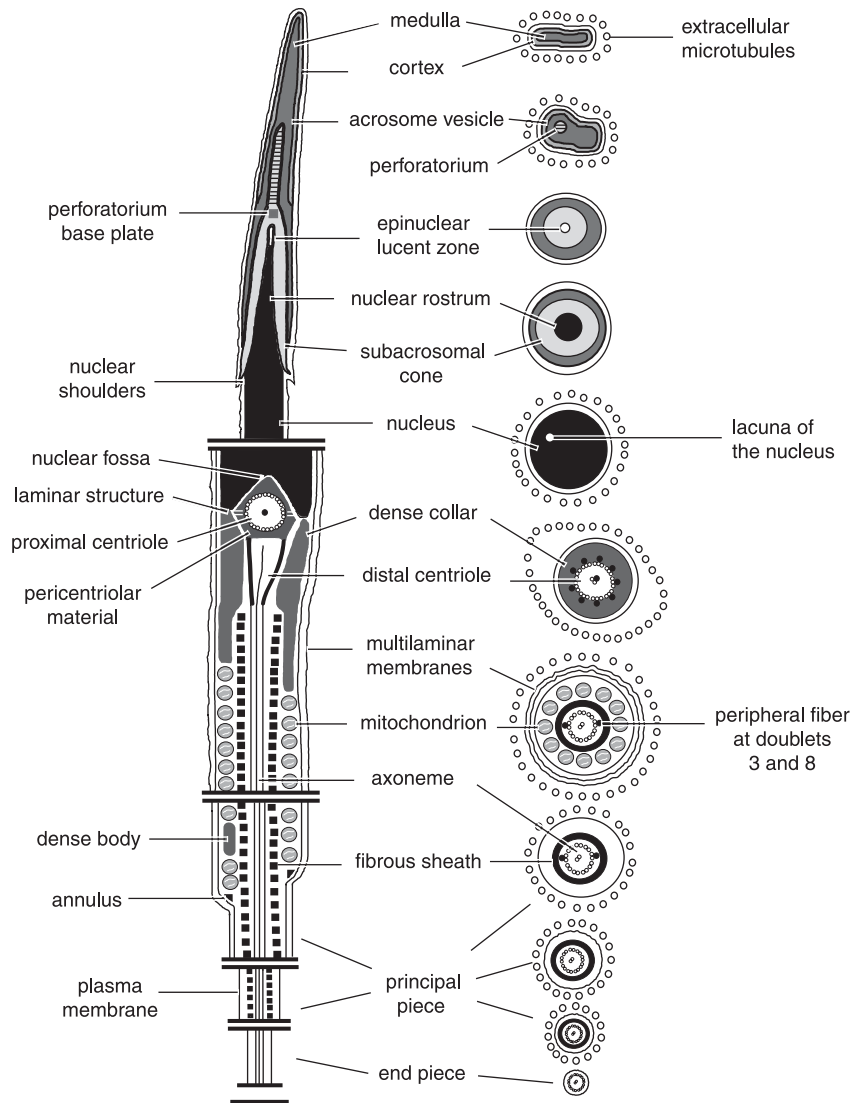


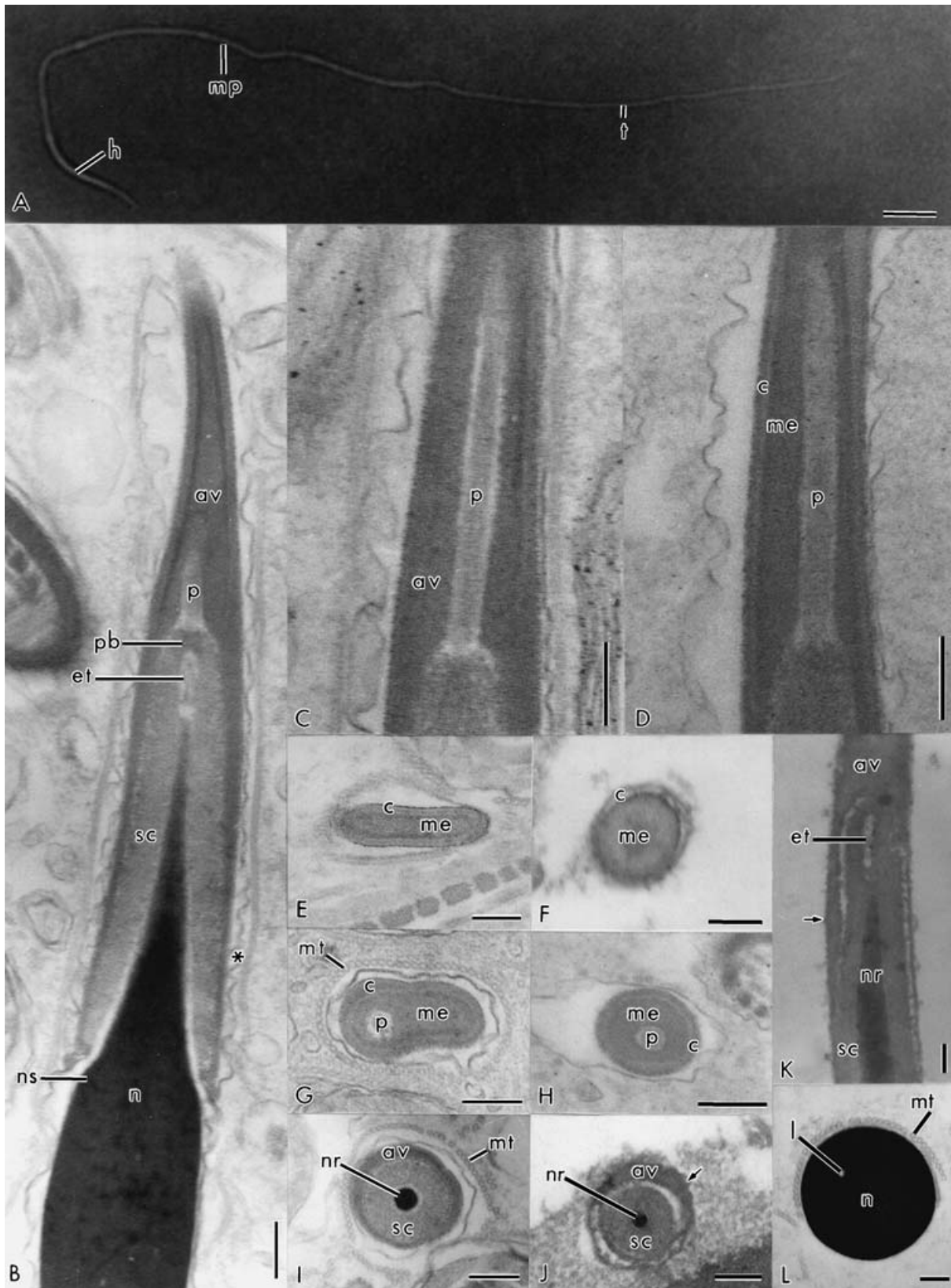
Fig. 1—Diagram of the spermatozoon of *Typhlops reticulatus* in longitudinal section and corresponding transverse section. Scales of various components are only approximate. Scale bar 10 μm .

shortly along the neck length. It consists of nine triplets of microtubules and two central singlets of the axoneme (Fig. 3C). Each triplet is connected with a peripheral dense fibre; besides these, there is another fibre that accompanies the central singlets (Fig. 3C). These fibres originate from the pericentriolar material (Fig. 3A,B). The dense collar surrounds both centrioles and no mitochondria juxtapose its outer face. The material of the dense collar (Fig. 3A,B) resembles that of the dense bodies (Fig. 3D) found in the midpiece.

Midpiece

The midpiece begins at the nuclear fossa and ends posteriorly with the annulus. It consists of the neck elements, the axoneme, the fibrous sheath, the mitochondria and the dense bodies,

and is encircled by a complex of membranes instead of a single plasma membrane, forming the multilaminar membranes (Fig. 3A). Outside these multilaminar membranes, there are extracellular microtubules, which can also be observed in the head (Fig. 2G,L), midpiece (Fig. 3C,F,G) and tail (Fig. 3M,N). These structures could not be observed in the spermatozoon of *Li. beui*, presumably because of the quality of the material. The axoneme presents a 9 + 2 pattern of double microtubules connected with the peripheral fibres (Fig. 3E–G). The peripheral fibres narrow continuously along the length of the midpiece until they disappear, although fibres 3 and 8 persist, enlarged and detached from their respective doublets (Fig. 3E–H). The fibrous sheath surrounds the axoneme and extends forward until the level of the dense collar, coinciding with the transition between the distal centriole and the axoneme (Fig. 3B). Dense bodies lie



among mitochondria (Fig. 3D), appearing in transverse sections as complete (Fig. 3G) or incomplete rings (Fig. 3H) that juxtapose the fibrous sheath. In longitudinal sections, they form columnar structures (Fig. 3D). Mitochondria present linear cristae internally (Fig. 3E,F), and appear as sinuous tubules that run around the fibrous sheath, forming a regular zig-zag arrangement in oblique sections (Fig. 3I). Longitudinally, they appear rounded in the three species (Fig. 3J,K). In transverse sections, however, they vary in form: forming irregular structures in *Le. koppesi* (Fig. 3E) and being rounded in the other two species (Fig. 3F). An electron-dense annulus, albeit reduced, can be differentiated between the species: in *T. reticulatus* and *Li. beui* it appears triangular (Fig. 3J), whereas in *Le. koppesi* it is linear (Fig. 3K).

Principal and end pieces

The principal piece extends posterior to the annulus, being formed by the axoneme, the fibrous sheath and the plasma membrane. Fibres 3 and 8 are still present at the transition between the midpiece and the principal piece, although reduced in thickness (Fig. 3L). The amount of cytoplasm between the fibrous sheath and the plasma membrane reduces along the axoneme until these latter structures juxtapose (Fig. 3M). There is no fibrous sheath and the diameter is reduced at the end piece (Fig. 3N).

Among four species of scolecophidian snakes (three species analysed herein and *R. waitii* (Harding *et al.* 1995), we found the following eight polymorphic characters, summarized in Fig. 4: (1,2) absence of base plate (Fig. 4B) and presence of acrosome vacuity subdivision in *R. waitii* (Fig. 4E); (3) pointed perforatorium tip in *T. reticulatus* (Fig. 4C), and rounded in *Le. koppesi* and *R. waitii* (Fig. 4D); (4) acrosome flattened in transverse section in *T. reticulatus* (Fig. 4G), and circular in *Li. beui*, *Le. koppesi* and *R. waitii* (Fig. 4H), respectively; (5) unilateral ridge of the acrosome surface present only in *Li. beui* (Fig. 4I); (6) absence of a central electron-dense structure within the proximal centriole in *Le. koppesi* (Fig. 4L); (7) annulus triangular in *T. reticulatus* and *Li. beui* (Fig. 4M), and linear in *Le. koppesi* (Fig. 4N);

(8) irregular mitochondria in transverse section in *Le. koppesi* (Fig. 4O), and rounded in *T. reticulatus*, *Li. beui*, and *R. waitii* (Fig. 4P), respectively. Figure 4(B,E) were based on Harding *et al.* (1995).

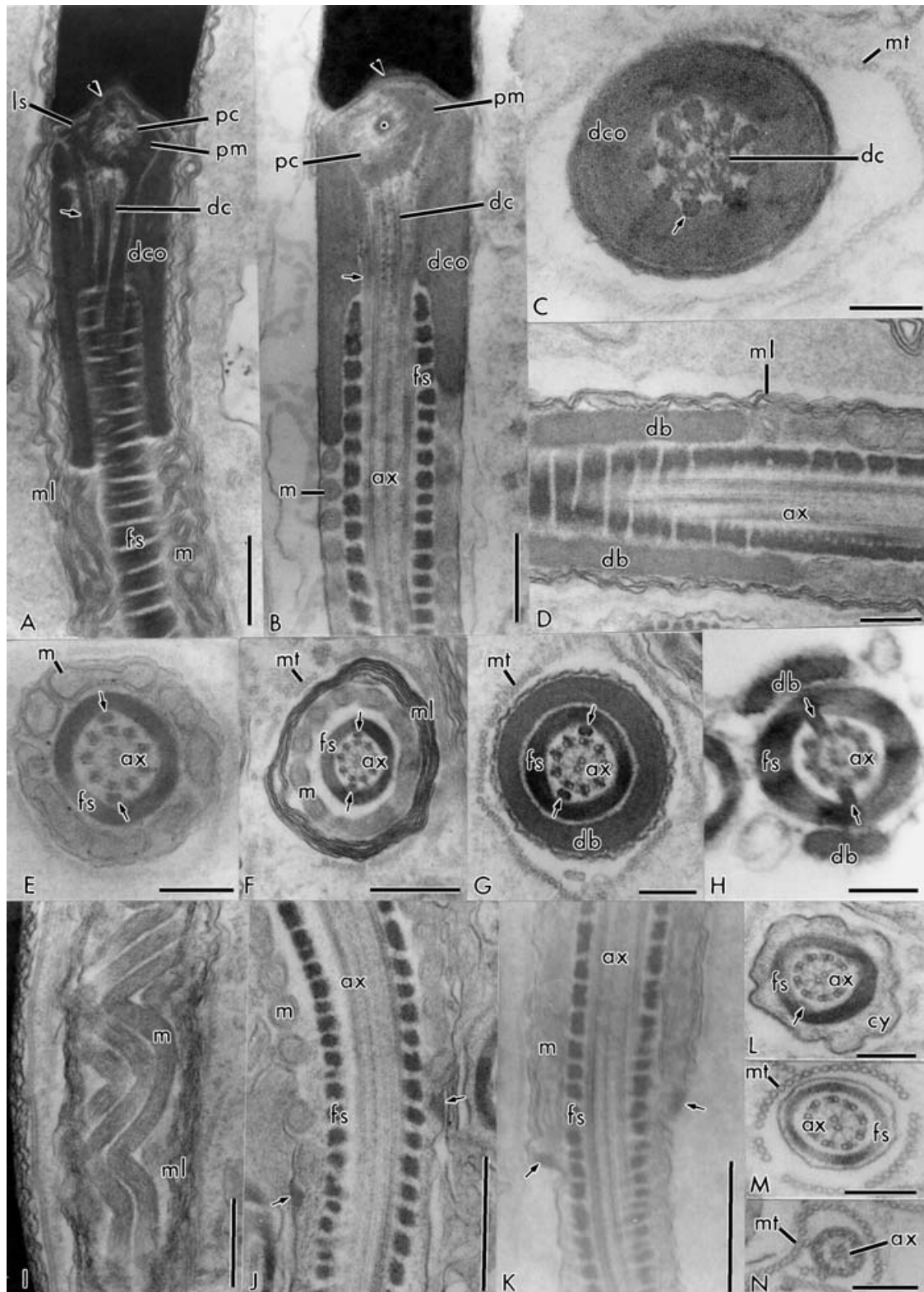
Discussion

The following characters, present in the spermatozoa of *Le. koppesi* (Leptotyphlopidae), *T. reticulatus* (Typhlopidae), *Li. beui* (Anomalepididae) and *R. waitii* (Typhlopidae) (Harding *et al.* 1995), were recognized (Healy and Jamieson 1994; Harding *et al.* 1995; Jamieson 1995, 1999) as synapomorphies of Squamata: wholly prenuclear perforatorium; absence of endonuclear canals; sinuous mitochondria with linear cristae; intermitochondrial dense bodies; fibrous sheath penetrating anteriorly into midpiece; rounded nuclear shoulders; paracrystalline subacrosomal cone; axoneme forming the major axial component of the midpiece; short distal centriole; and reduced annulus. The presence of an epinuclear lucent zone, regarded as a synapomorphy of Squamata (Healy and Jamieson 1994; Harding *et al.* 1995; Jamieson 1995, 1999), is confirmed in *Le. koppesi*, in *T. reticulatus* and in *Li. beui*, but it is not apparent in *R. waitii* (Harding *et al.* 1995).

The spermatozoa of *Le. koppesi*, *T. reticulatus*, *Li. beui* and *R. waitii* (Harding *et al.* 1995) bear the following characters, which are considered synapomorphies of Serpentes (Harding *et al.* 1995; Oliver *et al.* 1996; Jamieson 1999): presence of dense collar, multilaminar membranes and extracellular microtubules; reduction of the perforatorium base plate and the epinuclear lucent zone; and the unusual elongation of the midpiece.

Leptotyphlops koppesi, *T. reticulatus*, *Li. beui* and *R. waitii* (Harding *et al.* 1995) share 14 features: subdivision of acrosome vesicle in cortex and medulla; paracrystalline subacrosomal cone; single perforatorium; absence of endonuclear canals; presence of dense collar; fibres 3 and 8 enlarged along the midpiece; mitochondria arranged as sinuous tubes in oblique section; mitochondria rounded in longitudinal sections; solid intermitochondrial dense bodies juxtaposed

Fig. 2—Spermatozoa of *Leptotyphlops koppesi*, *Typhlops reticulatus* and *Liotyphlops beui*. —**A**. Light micrograph showing entire spermatozoon of *T. reticulatus* with head (h), midpiece (mp) and tail (t). —**B–L**. Transmission electron micrographs of the head. —**B**. Longitudinal section through the acrosome complex of *T. reticulatus* showing acrosome vesicle, subacrosomal cone, epinuclear lucent zone, perforatorium, stopper-like perforatorium base plate, nucleus, nuclear shoulders and multilaminar membranes (*). —**C, D**. Longitudinal section through the acrosome complex showing a pointed perforatorium tip in *T. reticulatus* and a rounded perforatorium tip in *Le. koppesi*, respectively. —**E, F**. Transverse section through the flattened acrosome of *T. reticulatus* and circular acrosome of *Li. beui*, respectively, showing medulla and cortex. —**G, H**. Transverse section through the acrosome at the level of the perforatorium of *T. reticulatus* and *Le. koppesi*, respectively. Note extracellular microtubules in G. —**I, J**. Transverse section through the acrosome complex showing acrosome vesicle, subacrosomal cone, and nuclear rostrum of *T. reticulatus* and *Li. beui*, respectively. Note extracellular microtubules in I and a unilateral ridge on the acrosome surface (arrow in J). —**K**. Longitudinal section through the acrosome complex of *Li. beui* showing acrosome vesicle, subacrosomal cone, epinuclear lucent zone, nuclear rostrum and unilateral ridge on acrosome surface (arrow). —**L**. Transverse section through the nucleus showing the nuclear lacuna and extracellular microtubules in *T. reticulatus*. av = acrosome vesicle; c = cortex of the acrosome vesicle; et = epinuclear lucent zone; l = nuclear lacuna; me = medulla of the acrosome vesicle; mt = extracellular microtubules; n = nucleus; nr = nuclear rostrum; ns = nuclear shoulder; p = perforatorium; pb = perforatorium base plate; sc = subacrosomal cone. Scale bar = 0.2 µm.



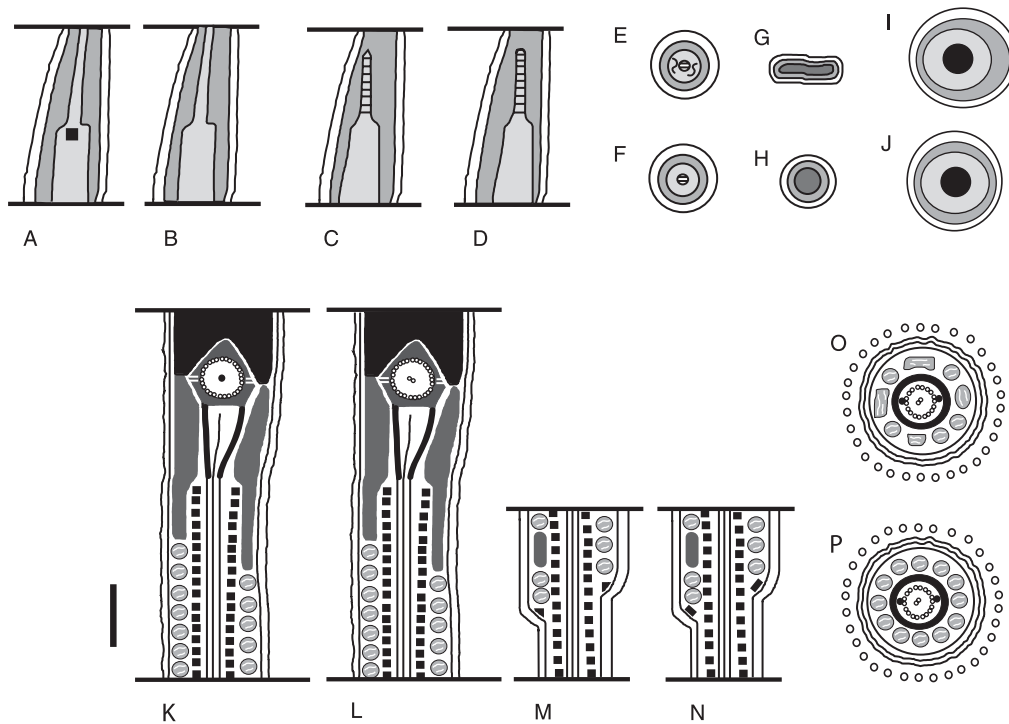


Fig. 4—Diagram of the spermatozoon bearing the polymorphic characters among scolecocephalian snakes. —**A–J**. Section of the acrosome complex region. —**A, B**. Presence of base plate in *Typhlops reticulatus*, *Leptotyphlops koppersi* and *Liotyphlops beui*, and its absence in *Ramphotyphlops waitii*, respectively. —**C, D**. Pointed perforatorium tip in *T. reticulatus*, and rounded perforatorium tip in *Le. koppersi* and *R. waitii*, respectively. —**E, F**. Presence of acrosome vacuity subdivision in *R. waitii*, and its absence in the other three species, respectively. —**G, H**. Flattened acrosome in *T. reticulatus* and circular acrosome in *Li. beui*, *Le. koppersi* and *R. waitii*, respectively. —**I, J**. Presence of unilateral ridge at the acrosome surface in *Li. beui*, and its absence in *T. reticulatus*, *Le. koppersi* and *R. waitii*, respectively. —**K–P**. Section of the midpiece. —**K, L**. Presence of a central electron-dense structure within the proximal centriole in *T. reticulatus* and *Li. beui*, and its absence in *Le. koppersi*, respectively. —**M, N**. Triangular annulus in *T. reticulatus* and *Li. beui* and linear annulus in *Le. koppersi*, respectively. —**O, P**. Irregular mitochondria in *Le. koppersi*, and rounded mitochondria in *T. reticulatus*, *Li. beui*, and *R. waitii*, respectively. (**B**) and (**E**) are redrawn from Harding *et al.* (1995). Scales of spermatozoon components are only approximate. Scale bar = 0.2 μ m.

Fig. 3—Spermatozoa of *Leptotyphlops koppersi*, *Typhlops reticulatus* and *Liotyphlops beui*. —**A–N**. Transmission electron micrographs of the midpiece and tail. —**A, B**. Longitudinal section of the midpiece of *Le. koppersi* and *T. reticulatus*, respectively, showing the nuclear fossa, pericentriolar material, proximal centriole, distal centriole, peripheral fibres (arrow), axoneme, dense collar, fibrous sheath and mitochondria. Note in **A**, multilaminar membranes and stratified laminar structure. Note in **B**, central electron-dense structure lying within the proximal centriole (asterisk). —**C**. Transverse section through the proximal centriole of *Le. koppersi* showing distal centriole, peripheral fibres (arrow), extracellular microtubules and dense collar. —**D**. Longitudinal section of the midpiece of *Le. koppersi* showing the axoneme, multilaminar membranes and dense bodies. —**E**. Transverse section through the midpiece of *Le. koppersi* showing fibrous sheath, peripheral fibres (arrow), axoneme, and mitochondria. —**F**. Transverse section through the midpiece of *T. reticulatus* showing fibrous sheath, peripheral fibres (arrow), axoneme, mitochondria, extracellular microtubules, and multilaminar membranes. —**G**. Transverse section through the midpiece of *Le. koppersi* showing fibrous sheath, peripheral fibres (arrow), axoneme, dense body, and extracellular microtubules. —**H**. Transverse section through the midpiece of *Li. beui* showing fibrous sheath, peripheral fibres (arrow), dense body and axoneme. —**I**. Oblique section of the midpiece of *T. reticulatus* showing mitochondrial arrangement and multilaminar membranes. —**J, K**. Longitudinal section of the midpiece of *T. reticulatus* and *Le. koppersi*, respectively, showing axoneme, fibrous sheath, mitochondria and annulus (arrow). —**L**. Transverse section through the anterior region of the principal piece of *T. reticulatus* showing axoneme, fibrous sheath, cytoplasm and fibres 3 and 8 (arrow). —**M**. Transverse section through the posterior region of principal piece of *T. reticulatus* showing axoneme, fibrous sheath and extracellular microtubules. —**N**. Transverse section through the endpiece of *T. reticulatus* showing axoneme and extracellular microtubules. ax = axoneme; an = annulus; cy = cytoplasm; db = dense body; dco = dense collar; dc = distal centriole; fs = fibrous sheath; ls = stratified laminar structure; m = mitochondria; ml = multilaminar membranes; mt = extracellular microtubules; nf = nuclear fossa; pc = proximal centriole; pm = pericentriolar material. **A, B, F, I–K**: scale bar = 0.5 μ m; **C–E, G, H, L–N**: scale bar = 0.2 μ m.

with the fibrous sheath in transverse sections; fibrous sheath beginning before first mitochondrion; presence of annulus; fibres 3 and 8 at the anteriormost region of the principal piece. The presence of an epinuclear lucent zone, nuclear lacunae and bilateral stratified laminar structures is a common trait among *Le. koppesi*, *T. reticulatus* and *Li. beui*; there is no information about these structures for *R. waitii*. *Leptotyphlops koppesi*, *T. reticulatus* and *R. waitii* share with each other mitochondria with linear cristae, multilaminar membranes and extracellular microtubules, but this could not be determined in *Li. beui*.

Liotyphlops beui, *Le. koppesi* and *R. waitii* (Harding *et al.* 1995) present an acrosome vesicle which is round at the anteriormost region in transverse sections; *Le. koppesi* and *R. waitii* share a rounded perforatorium tip. *Liotyphlops beui*, *T. reticulatus* and *R. waitii* share the presence of a central electron-dense structure in the proximal centriole and rounded mitochondria in transverse sections; the two former species also have a triangular annulus in common. The presence of an acrosome vacuity and the confirmed absence of a base plate of the perforatorium are peculiar to *R. waitii* (Harding *et al.* 1995) spermatozoa. Only *Le. koppesi*, among the analysed species, has irregular mitochondria in transverse sections and a linear annulus and does not present an electron-dense structure of the proximal centriole. An anteriorly depressed acrosome and a pointed perforatorium tip are found only in *T. reticulatus* spermatozoon. The noticeable ridge on the acrosome vesicle is peculiar to *Li. beui*.

The position of Leptotyphlopidae as a sister group of the clade comprised of Anomalepididae and Typhlopidae, supported by molecular data (Vidal and Hedges 2002b) and somatic morphological data (Rieppel 1988b; Cundall *et al.* 1993; Scanlon and Lee 2000; Lee and Scanlon 2002), is corroborated by two traits of sperm ultrastructure: *T. reticulatus*, *Li. beui* and *R. waitii* share with each other an electron-dense structure inside the proximal centriole and the mitochondrial shape in transverse sections; *T. reticulatus* and *Li. beui* share the triangular annulus. On the other hand, the hypothesis of Heise *et al.* (1995), considering Typhlopidae a sister group of Leptotyphlopidae, instead of Anomalepididae, has some support in one sperm trait, because *Le. koppesi* and *T. reticulatus* spermatozoa do not bear a ridge on their acrosome surfaces, in contrast to the spermatozoa of *Li. beui*.

The comparison of the sperm ultrastructure of the two species of Typhlopidae, *T. reticulatus* and *R. waitii* suggests the existence of intrafamilial polymorphism, including the shape of the anteriormost region of the acrosome complex and the structure of the perforatorium. Giugliano *et al.* (2002) indicated that polymorphic characters are found within all families of Squamata. The variation seen in *T. reticulatus* and *R. waitii* suggests that examination of other members of Scolecophidia may provide additional characters to resolve intrafamilial relationships and determine characters that are most profitable in phylogenetic reconstructions. In addition, characters obtained from the

sperm ultrastructure of blindsnakes may provide insights into the debate of snake origins and phylogenetic relationships.

Acknowledgements

We thank Maria Carolina Luque for her insightful comments and suggestions, Gustavo Vieira for his technical support, and Dr Francisco Franco (Instituto Butantan), who made available the specimens of *Li. beui*. This study was supported by a graduate fellowship from CNPq to L.T.B. (140969/03–9), by research fellowships from CNPq to G.R.C. (302343/88–1) and S.N.B. (520130/97–9), and by research grants from CAPES, CNPq, FINATEC, and FINEP.

References

- Cundall, D., Wallach, V. and Rossman, D. A. 1993. The systematic relationships of the snake genus *Anomochilus*. – *Zoological Journal of the Linnean Society* **109**: 275–299.
- Giugliano, L. G., Teixeira, R. D., Colli, G. R. and Bão, S. N. 2002. Ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Ameiva ameiva*, with considerations on polymorphism within the family Teiidae (Squamata). – *Journal of Morphology* **253**: 264–271.
- Greene, H. W. 1997. – *Snakes. The Evolution of Mystery in Nature*, p. 149. – University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Groombridge, B. C. 1979. Variations in morphology of the superficial palate of henophidian snakes and some possible systematic implications. – *Journal of Natural History* **13**: 447–475.
- Harding, H. R., Aplin, K. P. and Mazur, M. 1995. Ultrastructure of spermatozoa of Australian blindsnakes, *Ramphotyphlops* spp. (Typhlopidae, Squamata): first observation on the mature spermatozoon of scolecophidian snakes. In Jamieson, B. G. M., Ausio, J. and Justine, J. L. (Eds): – *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*, pp. 385–396. – Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- Healy, J. M. and Jamieson, B. G. M. 1994. The ultrastructure of spermatogenesis and epididymal spermatozoa of the tuatara *Sphenodon punctatus* (Sphenodontia, Amniota). – *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **344**: 187–199.
- Heise, P. J., Maxson, L. R., Dowling, H. G. and Hedges, S. B. 1995. Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. – *Molecular Biology and Evolution* **12**: 259–265.
- Jamieson, B. G. M. 1995. – The ultrastructure of spermatozoa of the Squamata (Reptilia) with phylogenetic considerations. In Jamieson, B. G. M., Ausio, J. and Justine, J. (Eds): – *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*, pp. 359–383. – Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Jamieson, B. G. M. 1999. Spermatozoal phylogeny of the Vertebrata. In Gagnon, C. (Ed.): – *The Male Gamete: from Basic Science to Clinical Applications*, pp. 303–331. – Cache River Press, Vienna, Illinois.
- Lee, M. S. Y. and Scanlon, J. D. 2002. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. – *Biological Reviews* **77**: 333–401.
- Oliver, S. C., Jamieson, B. G. M. and Scheltinga, D. M. 1996. The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). – *Herpetologica* **52**: 216–241.
- Rieppel, O. 1988a. The classification of the Squamata. In Benton, M. J. (Ed.): – *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods*, 1:

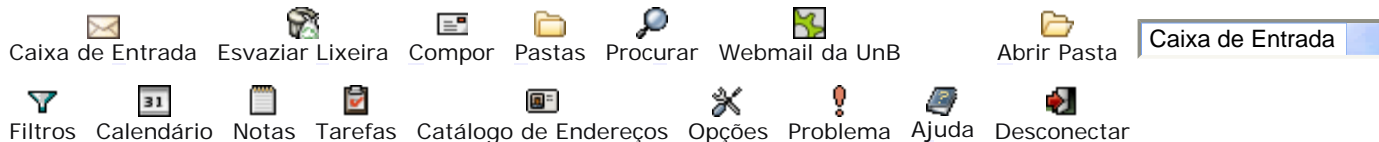
- Amphibians, Reptiles, and Birds*, pp. 278–283. – The Clarendon Press, Oxford.
- Rieppel, O. 1988b. A review of the origin of snakes. In Hecht, M. K., Wallace, B. and Prance, G. T. (Eds): *Evolutionary Biology*, 22, pp. 37–130. – Plenum Press, New York.
- Scanlon, J. D. and Lee, M. S. Y. 2000. The Pleistocene serpent *Wonambi* and the early evolution of snakes. – *Nature* **403**: 416–420.
- Tavares-Bastos, L., Teixeira, R. D., Colli, G. R. and B ao, S. N. 2002. Polymorphism in the sperm ultrastructure among four species of lizards in the genus *Tupinambis* (Squamata: Teiidae). – *Acta Zoologica (Stockholm)* **83**: 297–307.
- Tchernov, E., Rieppel, O., Zaher, H., Polcyn, M. J. and Jacobs, L. L. 2000. A fossil snake with limbs. – *Science* **287**: 2010–2012.
- Teixeira, R. D., Colli, G. R. and B ao, S. N. 1999. The ultrastructure of the spermatozoa of the lizard *Micrablepharus maximiliani* (Squamata, Gymnophthalmidae), with considerations on the use of sperm ultrastructure characters in phylogenetic reconstruction. – *Acta Zoologica (Stockholm)* **80**: 47–59.
- Underwood, G. 1967. *A Contribution to the Classification of Snakes – The British Museum Natural History Publication* no. 653, p. 179. British Museum of Natural History, London.
- Vidal, N. and Hedges, S. B. 2002a. Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. – *Comptes Rendus Biologies* **325**: 987–995.
- Vidal, N. and Hedges, S. B. 2002b. Higher-level relationships of snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. – *Comptes Rendus Biologies* **325**: 977–985.
- Vidal, N. and Hedges, S. B. 2004. Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. – *Proceedings of the Royal Society of London B* **271**: 226–229.
- Vieira, G. H. C., Colli, G. R. and B ao, S. N. 2004. The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Iguana iguana* (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. – *Journal of Anatomy* **204**: 451–464.
- Zaher, H. 1998. The phylogenetic position of *Pachyrhachis* within snakes (Squamata, Lepidosauria). – *Journal of Vertebrate Paleontology* **18**: 1–3.
- Zaher, H. and Rieppel, O. 1999. Tooth implantation and replacement in squamates, with special reference to mosasaur lizards and snakes. *American Museum Novitates* **3271**: 1–19.
- Zug, G. R., Vitt, L. J. and Caldwell, J. P. 2001. – *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, 2nd edn, p. 630. – Academic Press, San Diego, CA.

Anexo II

Artigo aceito para publicação no periódico *Zoomorphology*

L. Tavares-Bastos; G. R. Colli & S. N. Bão.

The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes). *Zoomorphology*. in press.



Caixa de Entrada: Re: FW: Zoomorphology (360 de 465)




[Excluir](#) | [Responder](#) | [Responder a Todos](#) | [Encaminhar](#) | [Redirecionar](#) | [Ver Discussão](#) | [Lista Negra](#) | [Lista Branca](#) | [Código Fonte da Mensagem](#) | [Salvar como](#) | [Imprimir](#) | [Reportar como Spam](#)

Data: Thu, 01 Feb 2007 17:28:04 +0100 [1/02/2007 14:28:04 BRT]

De: tbartol@zoosyst-berlin.de 

Para: CNielsen@snm.ku.dk 

Cc: leonora@unb.br 

Assunto: Re: FW: Zoomorphology

Cabeçalhos: [Exibir Todos os Cabeçalhos](#)

Dear Dr. Bastos, the manuscript has been reviewed and both reviewers recommended acceptance after minor revision. I send the manuscript back to Brasil early in December together with some editorial advices.

Best regards

Thomas Bartolomaeus

Zitat von "Nielsen, Claus \ (ZM\)" <CNielsen@snm.ku.dk>:

[Ocultar Texto Citado]

> Dear Thomas,
> Can you give the poor lady an answer? Best wishes. Yours, Claus
>
>

> Dr Claus Nielsen
> Professor of Evolutionary Invertebrate Embryology
> Zoological Museum (University of Copenhagen)
> Universitetsparken 15
> DK-2100 Copenhagen
> DENMARK
> phone: +45 3532 1066; fax: +45 3532 1010
> e-mail: cnielsen@zmuc.ku.dk
> www.zmuc.dk/InverWeb/staff/Claus_Nielsen/cnielsen.htm
>
>

> -----Original Message-----

> From: leonora@unb.br [mailto:leonora@unb.br]

> Sent: 31. januar 2007 19:01

> To: Nielsen, Claus (ZM)

> Subject: Zoomorphology
>

> Dear Claus Nielsen, I've been sending mails to Mr. Thomas Bartolomaeus, the
> Chief Editor of Zoomorphology, and I didn't get a position about the
> submission of my paper entitled "The evolution of sperm ultrastructure among
> boid snakes (Serpentes, Boidae)" (L.
> Tavares-Bastos, G. R. Colli and S. N. Bão) for publicaiton in Zoomorphology.
> In September Mr. Bartolomaeus wrote me telling that I would get an answer in
> two weeks, and I'm still waiting for it. Because of this I'm asking if you
> have some information about my paper. Best regards, Leonora Tavares Bastos
>
>
>

> -----
> This message was sent using IMP, the Internet Messaging Program.
>
>

[Excluir](#) | [Responder](#) | [Responder a Todos](#) | [Encaminhar](#) | [Redirecionar](#) | [Ver Discussão](#) | [Lista Negra](#) | [Lista Branca](#) | [Código Fonte da Mensagem](#) | [Salvar como](#) | [Imprimir](#) | [Reportar como Spam](#)




The evolution of sperm ultrastructure among Boidae (Serpentes)

L. Tavares-Bastos¹; G. R. Colli² and S. N. Bão³

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, 70919-900, Brasília, DF, Brasil, e-mail: leonoraunbbr@gmail.com

²Departamento de Zoologia, Universidade de Brasília, 70919-900, Brasília, DF, Brasil, e-mail: grcolli@unb.br

³Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70919-900, Brasília, DF, Brasil, e-mail: snbao@unb.br

Key words: character evolution, ultrastructure, spermatozoa, Boidae, Serpentes.

Running Headline: Sperm evolution in boid snakes

Number of text pages: 20

Figures: 5

Tables: 3

Corresponding author: Leonora Tavares Bastos, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70919-970, Brasília, DF, Brazil, E-mail: leonoraunbbr@gmail.com

ABSTRACT

We investigate the evolution of sperm ultrastructure among three species of Boidae (*Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, and *Corallus hortulanus*). Spermatozoa of these species are filiform consisting of a head region, containing the nucleus and acrosome complex, a midpiece, and a tail region subdivided into principal piece and endpiece. Multilaminar membranes and extracellular microtubules were observed next to the plasma membrane of the spermatozoa. The following differences were observed among the species: ridge on acrosome surface in *B. c. amarali* (absent in *E. cenchria* and *C. hortulanus*), stopper-like perforatorium base plate in *B. c. amarali* and *E. cenchria* (absent in *C. hortulanus*), rounded mitochondria in transverse section in *E. cenchria* and *C. hortulanus* (irregular in *B. c. amarali*). We mapped sperm characters onto two phylogenies based on morphological (Kluge, 1991) and molecular (Austin, 2000) data, using a number of squamate species as outgroups. We identified thirty-one unambiguous character transformations in the morphological phylogeny and thirty in the molecular phylogeny, but only thirteen and twelve transformations, respectively, are possible synapomorphies. We identified novel sperm synapomorphies, which were common between the morphological and molecular phylogenies: absence of perforatorium base plate and mitochondria arranged as sinuous tubes in oblique section (Serpentes), acrosome vesicle not subdivided and fibers 3 and 8 at the anteriormost region of principal piece (Boidae), and absence of an electron dense structure inside the proximal centriole (Elapidae + Colubridae). Our results suggest greater agreement between sperm ultrastructure and gross anatomical characters. In addition, we found no tendency for more homoplasies in the sperm head than in the flagellum, as recorded in previous studies.

INTRODUCTION

Tracing character states onto a proposed phylogeny permits inferences about the course of character evolution and is a powerful tool in comparative analysis (Pagel, 1999). The analysis of character evolution can also be used to test hypotheses of similarity and variability due to common inheritance, i.e., homology, or to repeated and independent evolutionary events, i.e., homoplasy (Brooks & McLennan, 1991; Harvey & Pagel, 1991). Incongruence between mapped characters and a proposed phylogeny is considered the result of adaptive convergence (McCracken et al., 1999), whereas good agreement between mapped characters and a proposed phylogeny indicates that characters are fixed in their evolution or, still, that characters are better predictors of phylogeny (Schwenk, 1993; Brown et al., 2000).

A considerable amount of information has recently been accumulated on the ultrastructure of the spermatozoa of Squamata (Harding et al., 1995; Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996; Teixeira et al., 1999b, a, c; Teixeira et al., 1999d; Giugliano et al., 2002; Tavares-Bastos et al., 2002; Vieira et al., 2004). Repeated instances of the evolution of limblessness associated with fossoriality have plagued phylogenetic analyses of Squamata based on classical morphological (mainly osteological) data sets (Lee, 2005). This has led to phylogenetic analyses based on sperm ultrastructure data (Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996; Teixeira et al., 1999b, c; Vieira et al., 2004), based on the premises that these characters hold significant phylogenetic signal and are less susceptible to convergence (Jamieson, 1995a, b; Teixeira et al., 1999b). Nevertheless, these attempts suffer from limitations related to the small number of characters and reduced taxonomic sampling (Jamieson, 1995b; Teixeira et al., 1999b). The recent use of large molecular data sets produced even more conflicting hypotheses (Townsend et al., 2004) and a consensual, widely accepted phylogeny of Squamata is still warranted. With few exceptions (Tavares-Bastos et al., 2002; Vieira et al., 2004), no studies have investigated the evolution of the ultrastructure of the sperm cell among squamates.

Species of Boidae range from western North America to southern South

America, West Indies, central Africa to south Asia, Madagascar, and southwest Pacific islands. The group comprises two sub-groups: Boinae (*Boa*, *Candoia*, *Corallus*, *Epicrates*, *Eunectes*, and, *Sanzinia*) and Erycinae (*Charina* and *Eryx*) (Zug et al., 2001). The monophyly of Boidae is well corroborated, but separate analyses conducted on morphological (Kluge, 1991), molecular (Austin, 2000), or a combination of both sets of characters (Burbrink, 2005) lead to conflicting hypotheses of relationships among boids. A few ultrastructural studies on the sperm ultrastructure of boids include descriptions of the sperm tail (Austin, 1965), neck and midpiece (Hamilton & Fawcett, 1968) of *B. constrictor constrictor*. Tourmente et al. (2006) describe the spermatozoa of *B. c. occidentalis*. Herein we provide detailed descriptions of the ultrastructure of sperm of three species (*Ep. cenchria*, *B. c. amarali*, and *Co. hortulanus*) and investigate the evolution of sperm ultrastructure within Boidae.

MATERIAL AND METHODS

Sperm data and microscopical procedures

We obtained spermatozoa from adult specimens of *Epicrates cenchria* (Linnaeus, 1758), *Boa constrictor amarali* Linnaeus, 1758, and *Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758), collected in Chapada dos Guimarães, Mato Grosso State, Brazil (14° 52'S, 55° 48'W). We euthanized specimens with Tiopental®, removed testes and epididymides by dissection, and cut them into small pieces. We deposited specimens at the Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB 17492, 17495, 17494, respectively). We fixed testes and epididymides in a solution containing 2% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde, with 3% sucrose and 5mM CaCl₂, in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.2, at 4°C, for 24 h. Subsequently, we washed samples in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and postfixed them for 1 h in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5mM CaCl₂ in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The material was dehydrated in a series of ascending acetone (30%-100%) and embedded in Spurr's epoxy resin. We stained ultrathin sections with uranyl acetate and lead citrate, and made observations in a Jeol 1011 transmission electron

microscope. Images were acquired with a GATAN BioScan Camera, model 792.

Phylogenetic methods

To study the evolution of sperm ultrastructure, we coded 27 sperm ultrastructure characters into discrete states (Tables 1,2). We mapped character evolution on two phylogenies of Boidae based on morphological (Kluge, 1991) and molecular characters (Austin, 2000), using MacClade (Maddison & Maddison, 1992) and PAUP v. 4.0b 10 (Swofford, 2003), with Fitch optimization (Kitching et al., 1998). Character mapping is the reconstruction of character states at internal nodes on a given tree (Maddison & Maddison, 1992). When the evolution of characters could not be resolved unambiguously, i.e., when more than one most-parsimonious reconstruction (MPR) existed for a given character, we examined all MPRs using MacClade (Maddison & Maddison, 1992). We used *Nerodia sipedon* (Jamieson & Koehler, 1994), *Ramphotyphlops* ssp. (Harding et al., 1995), *Oxyuranus microlepidotus*, *Aspidites melanocephalus*, *Stegonotus cucullatus*, *Boiga irregularis*, *Varanus gouldii* (Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996), *Tupinambis merianae* (Tavares-Bastos et al., 2002), *Iguana iguana* (Vieira et al., 2004), and *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1994) as outgroups, to ascertain the direction of evolutionary change of characters. Outgroup relationships were based on Kluge (1993; Boidae and *Aspidites melanocephalus*), Vidal & Hedges (2004; Elapidae and Colubridae); and Lee (2005; remainder outgroups).

RESULTS

Ultrastructure of spermatozoa

Spermatozoa of *Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, and *Corallus hortulanus* are sufficiently similar to be described together. A generalized spermatozoon is represented diagrammatically in Figure 1. Spermatozoa are filiform, consisting of a head region (acrosome complex and nucleus), a midpiece, and a tail region (principal piece and endpiece).

Acrosome complex

The head in longitudinal section is long and attenuated (Figs. 2A,C). The acrosome complex is located at the anteriormost region of the head, and consists of the acrosome vesicle, the subacrosomal cone and the perforatorium (Figs. 2A,C). In cross sections, the acrosome complex appears depressed (Fig. 2D), becoming more circular at its base (Figs. 2E-G). A unilateral ridge is absent (Figs. 2A-C). The perforatorium extends from the anterior region of the subacrosomal cone into the acrosome vesicle and has a rounded tip. Embedded in the subacrosomal material, a perforatorium base plate is seen as a stopper-like structure (Fig. 2A), absent only in *Corallus hortulanus* (Fig. 2C). In both longitudinal and cross-sections, the subacrosomal cone exhibits a paracrystalline structure (Figs. 2A-C,F-G). An acrosome vacuity subdivision is absent (Figs. 2A-C). The epinuclear lucent zone is a narrow chamber within the anterior limit of the subacrosomal cone. It extends anteriorly from the tip of the nuclear space, is bounded by a membrane (Fig. 2B), and is approximately 11 nm long in *Epicrates cenchria*, 40 nm in *Boa constrictor amarali*, and 8 nm in *C. hortulanus*. Nuclear space at the nuclear point was observed in the three species studied (Fig. 2B). At its base, the acrosome complex rests on a region of the nucleus with a distinct shoulder-like shape, the nuclear shoulders, lying on a flange of subacrosomal material (Fig. 2A).

Nucleus

The nucleus is elongate in longitudinal section and circular in transverse section (Fig. 2A,C,H). In *Boa constrictor amarali*, *Epicrates cenchria*, and *Corallus hortulanus* the base width is approximately 44 nm, 43 nm, and 50 nm, respectively. The chromatin is strongly electron dense and lacks a lacuna (Fig. 2H). Anteriorly, the nucleus extends as a narrow cone and the nuclear rostrum length (Fig. 2A,C,G) is approximately 152 nm in *B. c. amarali*, 195 nm in *E. cenchria*, and 85 nm in *C. hortulanus*. The transition from the tapered apical portion to the cylindrical portion of the nucleus is abrupt and marked by nuclear shoulders (Fig. 2A). The base of the nucleus is marked by a concave depression, the nuclear fossa, which houses the proximal centriole (Fig. 3A). At its base,

next to the nuclear fossa, the diameter of the nucleus is approximately 62 nm in *B. c. amarali*, 59 nm in *E. cenchria*, and 58 nm in *C. hortulanus*.

Neck Region

The neck region is the junction between the nucleus and the midpiece. It contains the proximal and distal centrioles, including the dense collar and the first ring of mitochondria (Fig. 3A). The proximal centriole is short and partially surrounded by the dense pericentriolar material, which conforms in shape to the nuclear fossa and extends posteriorly between the two centrioles (Fig. 3A,C). A poorly developed lateral striated density, the stratified laminar structure, is continuous with the pericentriolar material and projects laterally from both sides of the anterior limit of the proximal centriole (Fig. 3C). An electron dense structure lies within the proximal centriole (Figs. 3C,F). The neck region contains a specialized structure, the dense collar, a shallow, roughly cylindrical mass of cytoplasm that surrounds the distal centriole (Figs. 3A,C,F). In cross section, it surrounds the distal centriole and the peripheral fibers (Fig. 3G). The distal centriole forms the basal body of the axoneme and consists of nine triplets of microtubules; nine peripheral fibers that partially cover the triplets, and two central singlets of the axoneme. This structure does not project into the fibrous sheath (Figs. 3A,C,F-G).

Midpiece

The midpiece is located at the anterior portion of the flagellum and includes the neck region and the axoneme, being surrounded by the fibrous sheath, mitochondria (Fig. 3A), and rings of dense bodies (Fig. 3B). A distinctive feature of the midpiece of the three species studied is the presence of a multilaminar membrane in addition to the plasma membrane (Figs. 3B,G). The axial component of the midpiece is the axoneme, composed of 9+2 microtubules, surrounded by nine peripheral fibers of dense material. These peripheral fibers associated with doublets 3 and 8 are thicker than the others and are separated from their corresponding doublets (Figs. 3H-J). A fibrous sheath surrounds

the axoneme, beginning in the midpiece at the level of mitochondria tier 1, and extends into the posterior midpiece as seen in longitudinal (Figs. 3A,B,E), and transverse sections (Figs. 3H-J). In longitudinal section, the mitochondria ends are rounded (Figs. 3A,B,E). In cross section, mitochondria appear as irregular structures with linear cristae. In oblique section, they form sinuous tubes, curved at angles greater than 45° and bent back upon themselves (Fig. 3F). The intermitochondrial dense bodies appear as solid structures and are poorly developed and scarce (Fig. 3B). In transverse section they appear juxtaposed to the fibrous sheath (Figs. 3H,J). Extracellular microtubules were observed, in cross section, next to the plasma membrane of the spermatozoa (Fig. 3I). The annulus is a small dense ring, poorly developed, with irregular shape in longitudinal section. It is closely attached to the inner surface of the plasma membrane and marks the end of the midpiece (Fig. 3E).

Principal piece

The principal piece is the longest part of the spermatozoon and lies behind the midpiece. It consists of the axoneme with a 9+2 microtubules pattern surrounded by the fibrous sheath, cytoplasm, and plasma membrane. In this region, dense bodies and mitochondria are absent, and extracellular microtubules are observed next to the plasma membrane of spermatozoa (Figs. 3K-L). In its anterior portion, a wide zone of finely granular cytoplasm sits between the fibrous sheath and the plasma membrane. The fibers adjacent to microtubules double 3 and 8 (arrow) and peripheral fibers are present in the anterior region (Fig. 3K) but absent in the posterior portion, where the plasma membrane becomes closely attached to the fibrous sheath (Fig. 3L).

Endpiece

The endpiece is the final part of the flagellum. It consists of the axoneme and plasma membrane; dense fibers, dense bodies, mitochondria, peripheral fibers, and the fibrous sheath are lacking. From the posterior portion of the endpiece, the pattern of microtubules becomes disarranged (Fig. 3M).

Evolution of sperm ultrastructure characters

The mapping of 27 sperm ultrastructure characters on the morphological phylogeny (Kluge, 1991) resulted in a tree length of 56, a consistency index (CI) of 0.57, and a retention index (RI) of 0.49, whereas the molecular phylogeny (Austin, 2000) resulted in a tree length of 57, a CI of 0.56, and a RI of 0.47, suggesting greater agreement between the sperm ultrastructure characters and the morphological phylogeny. The morphological phylogeny implied in 31 unambiguous character transformations, including 13 putative synapomorphies (Fig. 4A), whereas the molecular phylogeny implied in 30 unambiguous character transformations, including 12 putative synapomorphies (Fig. 4B). The remaining unambiguous transformations were autapomorphies. Eleven unambiguous character transformations were common between the morphological and molecular phylogenies (Figs. 4A,B), and can be regarded as synapomorphic, as follows:

Character 2. Subdivision of the acrosome vesicle: (0) absent, (1) present.

The subdivision of the acrosome vesicle is absent in *Boa constrictor amarali*, *Corallus hortulanus*, *Epicrates cenchria*, and present in the remainder taxa. The subdivision of the acrosome vesicle may have arisen in the ancestor of Squamata and may have been lost secondarily in Boidae.

Character 7. Perforatorium tip shape. (0) pointed, (1) rounded.

Rounded perforatorium tip was observed in *B. c. amarali*, *C. hortulanus*, *E. cenchria*, *B. irregularis*, *S. cucullatus*, *O. microlepidotus*, *Ramphotyphlops* spp, and *V. gouldii*, and pointed in the remainder. Rounded perforatorium tip is a presumed synapomorphy of Thecoglossa (=Varanidae + Serpentes, Lee, 1997), and may have been changed independently to pointed in *A. melanocephalus* and *N. sipedon*.

Character 8. Perforatorium base plate: (0) absent, (1) present, (2) not applicable.

The perforatorium base plate is absent in *C. hortulanus*, *Boiga irregularis*, *Stegonotus cucullatus*, *Oxyuranus microlepidotus*, *Aspidites melanocephalus*, and *Ramphotyphlops* spp; and present in the remainder taxa (not applicable in *Sphenodon punctatus*). The absence of the perforatorium base plate is a presumed synapomorphy of Serpentes.

Character 9. Perforatorium base plate shape. (0) knob-like, (1) stopper-like, (2) not applicable.

The shape of the perforatorium base plate is stopper-like in *B. c. amarali*, *E. cenchria*, and *N. sipedon*; knob-like in *I. iguana*, *T. merianae*, and *V. gouldii*; and not applicable in the remainder because the base plate is absent. The perforatorium base plate was probably lost in ancestor of Serpentes and may have been changed to stopper-like in *N. sipedon*.

Character 13. Electron dense structure inside the proximal centriole: (0) absent, (1) present.

An electron dense structure inside the proximal centriole is absent in *B. irregularis*, *Nerodia sipedon*, *O. microlepidotus*, and *Tupinambis merianae*, and present in *B. c. amarali*, *C. hortulanus*, *E. cenchria*, *S. cucullatus*, *A. melanocephalus*, *Iguana iguana*, and *Varanus gouldii*. The electron dense structure inside the proximal centriole was presumably lost in the clade uniting Elapidae and Colubridae and may have been gained secondarily in *S. cucullatus*.

Character 14. Dense collar: (0) absent, (1) present.

The dense collar is absent in *I. iguana*, *T. merianae*, *V. gouldii*, and *S. punctatus*; and present in the remainder. The presence of the dense collar is a putative synapomorphy of Serpentes.

Character 17. Mitochondria in oblique section. (0) columnar, (1) slightly curved, (2) sinuous tubes.

Mitochondria are columnar in *T. merianae*, *V. gouldii*, and *I. iguana*; rounded in *S. punctatus*; and arranged as sinuous tubes in the remainder. Mitochondria arranged as sinuous tubes in oblique section is a presumed synapomorphy of Serpentes.

Character 25. Fibers 3 and 8 at the anteriormost region of the principal piece. (0) absent, (1) present.

These fibers are absent in *B. irregularis*, *S. cucullatus*, *O. microlepidotus*, *A. melanocephalus*, *T. merianae*, *V. gouldii*, and *S. punctatus*; and present in the remainder. The absence of fibers 3 and 8 at the anteriormost region of the principal

piece is a presumed synapomorphy of Teiidae + Thecoglossa (=Varanidae + Serpentes, Lee, 1997), and may have been gained independently in Boidae, *N. sipedon*, and *Ramphotyphlops* spp (reversal).

Character 26. Multilaminar membranes: (0) absent, (1) present.

Multilaminar membranes are absent in *I. iguana*, *T. merianae*, *V. gouldii*, and *S. punctatus*; and present in the remainder. The presence of multilaminar membranes is a presumed synapomorphy of Serpentes.

Character 27. Extracellular microtubules: (0) absent, (1) present.

Extracellular microtubules are absent in *I. iguana*, *T. merianae*, *V. gouldii*, and *S. punctatus*; and present in the remainder. The presence of the extracellular microtubules is a presumed synapomorphy of Serpentes.

The mapping of sperm characters onto the morphological phylogeny (Fig. 4A) indicated that the following characters can additionally be regarded as synapomorphic:

Character 8. Perforatorium base plate. (0) absent, (1) present, (2) not applicable.

The perforatorium base plate is absent in *C. hortulanus*, *B. irregularis*, *S. cucullatus*, *O. microlepidotus*, *A. melanocephalus*, and *Ramphotyphlops* spp; and present in the remainder (not applicable in *S. punctatus*). The presence of the perforatorium base plate is a presumed synapomorphy of *E. cenchria* and *B. c. amarali*. The perforatorium base plate was presumably lost in the ancestor of Serpentes and may have been gained at least twice in this group (*N. sipedon* and in the clade uniting *E. cenchria* and *B. c. amarali*).

Character 9. Shape of perforatorium base plate. (0) knob-like, (1) stopper-like, (2) not applicable.

The shape of the perforatorium base plate is stopper-like in *B. c. amarali*, *E. cenchria*, and *N. sipedon*; knob-like in *I. iguana*, *T. merianae*, and *V. gouldii*; and not applicable in the remainder because the base plate is absent. A stopper-like perforatorium base plate is a presumed synapomorphy of *E. cenchria* and *B. c. amarali*.

The mapping of sperm characters onto the molecular phylogeny (Fig. 4B) indicated that the following can additionally be regarded as synapomorphic:

Character 1. Ridge on acrosome surface. (0) absent, (1) present.

The ridge of acrosome surface is present in *C. hortulanus*, *E. cenchria*, *N. sipedon*, *I. iguana*, and *V. gouldii*; and absent in the remainder. The presence of a ridge on the acrosome surface is a presumed synapomorphy of *E. cenchria* and *C. hortulanus*.

The mapping of sperm characters onto the morphological and molecular phylogenies indicated that the evolution of three characters (18, 19, and 22) could not be resolved unambiguously. Using the ACCTRAN method of character reconstruction, which accelerates changes toward the root, maximizing early gains and forcing subsequent reversals (Maddison & Maddison, 1992), we found two presumed synapomorphies of Teiidae + Thecoglossa (=Varanidae + Serpentes, Lee, 1997): trapezoidal mitochondria in longitudinal section and irregular mitochondria in transverse section. The fibrous sheath beginning at the level of mitochondrial tier 1 (Alethinophidia).

Characters that showed more homoplasy when mapped onto the morphological phylogeny were: characters 1 (ridge on acrosome surface, CI = 0.20) and 25 (fibers 3 and 8 at the anteriormost region of principal piece, CI = 0.25) (Fig. 5B); followed by characters 7 (tip of perforatorium, CI = 0.33) and 13 (electron dense structure inside proximal centriole, CI = 0.33) (Fig. 5B). The mapping of sperm characters onto the molecular phylogeny produced the same results, with the exception of characters 1 (CI = 0.25), 8, and 9 (CI = 0.40) (Fig. 5A). On the average, characters from the sperm head had a smaller consistency index and a greater number of evolutionary steps relative to characters from the flagellum, when mapped on both molecular and morphological phylogenies (Table 3). Nevertheless, these differences were not statistically significant (Table 3).

DISCUSSION

The sperm of species of Boidae we analyzed (*Boa constrictor amarali*, *Epicrates cenchria*, and *Corallus hortulanus*) differ in the ridge on acrosome surface (present in *B. c. amarali*, absent in *E. cenchria* and *C. hortulanus*), perforatorium base plate

(present/stopper-like in *B. c. amarali* and *E. cenchria*, absent in *C. hortulanus*), and mitochondria shape in transverse section (rounded in *E. cenchria* and *C. hortulanus*, irregular in *B. c. amarali*). The sperm tail of *B. c. constrictor* was described by Austin (1965) and Hamilton & Fawcett (1968) and our observations on *B. c. amarali* fully agree with theirs, with the exception of character 26 (multilaminar membranes), which was however considered as an artifact of fixation by Austin (1965). In addition, we described nine characters of the sperm tail (11, 12, 16, 20-25) not recorded by those authors. Tourmente et al. (2006) described the ultrastructure of the spermatozoa of *B. c. occidentalis*, which differs from *B. c. amarali* in the shape of mitochondria in transverse section (circular in *B. c. occidentalis* and irregular in *B. c. amarali*). Further, Tourmente et al. (2006) were not able to observe the epinuclear lucent zone, perforatorium, and perforatorium base plate.

Synapomorphies

The spermatozoa of *Boa constrictor amarali*, *Epicrates cenchria*, and *Corallus hortulanus* presents the following features, which are considered synapomorphies of Squamata (Healy & Jamieson, 1994; Harding et al., 1995; Jamieson, 1995b; Jamieson, 1999): a single wholly prenuclear perforatorium; loss of the endonuclear canal; epinuclear lucent zone present; mitochondrial cristae linear; sinuous mitochondria; intermitochondrial dense bodies present; fibrous sheath extends anteriorly into midpiece; nuclear shoulders rounded; paracrystalline subacrosomal cone; midpiece with axoneme, and not with centriole, forming the major axial component of this region; distal centriole short; and reduction of the annulus. The reduction or loss of the perforatorium base plate and epinuclear electron lucent zone, the presence of the dense collar (neck cylinder), multilaminar membranes, and extracellular microtubules observed by us corroborate synapomorphies of Serpentes recorded in previous works (Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996; Jamieson, 1999). We did not observe the great elongation of the midpiece among boid snakes, a presumed synapomorphy of Serpentes (Harding et al., 1995; Oliver et al., 1996; Jamieson, 1999). However, in our study the

midpiece was not wholly observed in electron microscopy longitudinal sections.

Independent evolutionary events or homoplasies

Homoplasy occurs when mapped characters are incongruous with a given phylogeny, and can be measured by the consistency index (ci) for individual characters, and ensemble values (CI) for cladograms (Kitching et al., 1998). Our results indicate no difference in rates of evolution between regions of the spermatozoon. Conversely, in the spermatozoa of *Iguana iguana* there is significantly more homoplasy and number of evolutionary changes in sperm head than in tail or midpiece characters (Vieira et al., 2004). Since the sperm head has the function of species-specific recognition of the oocyte during fertilization, whereas the flagellum is simply a carrier of the head with the genetic material, the first is expected to be more subject to evolutionary changes and homoplasies.

Phylogeny of Boidae

In recent years, many studies investigated the phylogeny of Boidae. The morphological analysis of Kluge (1991) indicated that *Boa* is more closely related to *Acrantophis* and *Sanzinia*, two genera from Madagascar, than to the Neotropical genera *Corallus*, *Epicrates*, and *Eunectes*. Using DNA sequence data from a portion of the mitochondrial cytochrome b, Austin (2000) concluded that *Boa* is the sister taxon of a New World clade of boines comprising *Epicrates*, *Corallus*, and *Eunectes*. More recently, Burbrink (2005) re-examined the phylogeny of Boidae focusing on the placement of *Boa constrictor* within the Boinae, using combined molecular (cytochrome b) and morphological data. He rejected Kluge's hypothesis, because the data presented poor statistical support with respect to inferring the position of *B. constrictor*, advancing that *Boa* is more closely related to New World genera (*Corallus*, *Eunectes* and *Epicrates*) than to other Old World genera (*Acrantophis* and *Sanzinia*). Our results, however, indicate better agreement between sperm ultrastructure and morphological characters, supporting Kluge's (1991) arrangement.

Concluding remarks

The sperm ultrastructure of the boid genera *Boa*, *Corallus*, and *Epicrates* displays previously recognized synapomorphies of Squamata. By mapping sperm characters onto two contrasting phylogenies of Boidae, with the addition of a large number of outgroup taxa, we identified presumed novel synapomorphies of Teiidae + Thecoglossa, Thecoglossa, Serpentes, Elapidae + Colubridae, and Boidae. In addition, sperm characters showed greater agreement with gross morphological than with molecular characters. We also found no tendency for more homoplasies in the sperm head than in the flagellum, as recorded in previous studies. The integration of comparative biology, phylogenetic reconstruction, and evolution history can provide a better understanding of the nature of variation in sperm ultrastructure characters.

Acknowledgments

We thank Reginaldo Constantino, Gustavo H. C. Vieira, Gabriel C. Costa, Maria Carolina Luque, and Rosana Tidon for their insightful comments and suggestions. This study was supported by a graduate fellowship from CNPq to LTB (140969/03-9), by research fellowships from CNPq to GRC (302343/88-1) and SNB (520130/97-9), and by research grants of CAPES, CNPq, FINATEC, and FINEP.

LITERATURE CITED

- Austin CC** (2000) Molecular phylogeny and historical biogeography of Pacific Island Boas (*Candoia*). *Copeia* **2**, 341-352.
- Austin CR** (1965) Fine structure of the snake sperm tail. *J. Ultrastr. Res.* **12**, 452-462.
- Brooks DR, McLennan DA** (1991) *Phylogeny, Ecology, and Behavior; a Research Program in Comparative Biology*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Brown B, Emberson RM, Paterson AM** (2000) Morphological character evolution in hepialid moths (Lepidoptera: Hepialidae) from New Zealand. *Biol. J. Linn. Soc.* **69**, 383-397.
- Burbrink FT** (2005) Inferring the phylogenetic position of *Boa constrictor* among the Boinae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **34**, 167-180.
- Giugliano LG, Teixeira RD, Colli GR, Báo SN** (2002) Ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Ameiva ameiva*, with considerations on polymorphism within the family Teiidae (Squamata). *J. Morphol.* **253**, 264-271.
- Hamilton DW, Fawcett DW** (1968) Unusual features of the neck and middle-piece of snake spermatozoa. *J. Ultrastr. Res.* **23**, 81-97.
- Harding HR, Aplin KP, Mazur M** (1995) Ultrastructure of spermatozoa of Australian blindsnakes, *Ramphotyphlops* spp. (Typhlopidae, Squamata): first observation on the mature spermatozoon of scolecophidian snakes. In *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy* (eds Jamieson BGM, Ausió J, Justine JL), pp. 385-396. Paris, France: Muséum National d'Histoire Naturelle.
- Harvey PH, Pagel MD** (1991) *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. New York: Oxford Univ. Press.
- Healy JM, Jamieson BGM** (1994) The ultrastructure of spermatogenesis and epididymal spermatozoa of the tuatara *Sphenodon punctatus* (Sphenodontia, Amniota). *Phil. Trans. R. Soc. London B* **344**, 187-199.
- Jamieson BGM** (1995a) Evolution of tetrapod spermatozoa with particular reference to amniotes. In *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy* (eds Jamieson

BGM, Ausio J, Justine J), pp. 343-358. Paris, France: Muséum National d'Histoire Naturelle.

Jamieson BGM (1995b) The ultrastructure of spermatozoa of the Squamata (Reptilia) with phylogenetic considerations. In *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy* (eds Jamieson BGM, Ausio J, Justine J), pp. 359-383. Paris, France: Muséum National d'Histoire Naturelle.

Jamieson BGM (1999) Spermatozoal phylogeny of the Vertebrata. In *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications* (ed, Gagnon C), pp. 303-331. Vienna, Illinois: Cache River Press.

Jamieson BGM, Koehler L (1994) The ultrastructure of the spermatozoon of the northern water snake, *Nerodia sipedon* (Colubridae, Serpentes), with phylogenetic considerations. *Can. J. Zool.* **72**, 1648-1652.

Kitching IJ, Forey PL, Humphries CJ, Williams DM (1998) *Cladistics. The Theory and Practice of Parsimony Analysis*. Oxford: Oxford University Press.

Kluge AG (1991) Boine snake phylogeny and research cycles. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan* **178**, 1-58.

Kluge AG (1993) *Aspidites* and the phylogeny of Pythonine snakes. *Rec. Aust. Mus.*, 1-77.

Lee MSY (1997) The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **352**, 53-91.

Lee MSY (2005) Squamate phylogeny, taxon sampling, and data congruence. *Org. Divers. Evol.* **5**, 25-45.

Maddison WP, Maddison DR (1992) *MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.

McCracken KG, Harshman J, McClellan DA, Afton AD (1999) Data set incongruence and correlated character evolution: an example of functional convergence in the hind-limbs of stiff-tail diving ducks. *Syst. Biol.* **48**, 683-714.

Oliver SC, Jamieson BGM, Scheltinga DM (1996) The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae

(Reptilia). *Herpetologica* **52**, 216-241.

Pagel M (1999) Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**, 877-884.

Schwenk K (1993) The evolution of chemoreception in squamate reptiles: A phylogenetic approach. *Brain Beh. Evol.* **41**, 124-137.

Swofford DL (2003) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Tavares-Bastos L, Teixeira RD, Colli GR, Bao SN (2002) Polymorphism in the sperm ultrastructure among four species of lizards in the genus *Tupinambis* (Squamata: Teiidae). *Acta Zool.-Stockholm* **83**, 297-307.

Teixeira RD, Colli GR, Bao SN (1999a) The ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Polychrus acutirostris* (Squamata, Polychrotidae). *J. Submicr. Cytol. Pathol.* **31**, 387-395.

Teixeira RD, Colli GR, Bao SN (1999b) The ultrastructure of the spermatozoa of the lizard *Micrablepharus maximiliani* (Squamata, Gymnophthalmidae), with considerations on the use of sperm ultrastructure characters in phylogenetic reconstruction. *Acta Zool.-Stockholm* **80**, 47-59.

Teixeira RD, Colli GR, Bao SN (1999c) The ultrastructure of the spermatozoa of the worm-lizard *Amphisbaena alba* (Squamata, Amphisbaenidae), and the phylogenetic relationships of amphisbaenians. *Can. J. Zool.* **77**, 1254-1264.

Teixeira RD, Vieira GHC, Colli GR, Bao SN (1999d) Ultrastructural study of spermatozoa of the neotropical lizards, *Tropidurus semitaeniatus* and *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae). *Tissue & Cell* **31**, 308-317.

Townsend T, Larson A, Louis E, Macey JR (2004) Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. *Syst. Biol.* **53**, 735-757.

Tourmente M, Cardozo G, Bertona M, Guidobaldi A, Giojalas L, Chiaraviglio M (2006) The ultrastructure of the spermatozoa of *Boa constrictor occidentalis*,

with considerations on its mating system and sperm competition theories. *Acta Zoologica* **87**, 25-32.

Vidal N, Hedges B (2004) Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. *Proc. R. Soc. Lond.* **271**, 226-229.

Vieira GHC, Colli GR, Bao SN (2004) The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Iguana iguana* (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. *J. Anat.* **204**, 451-464.

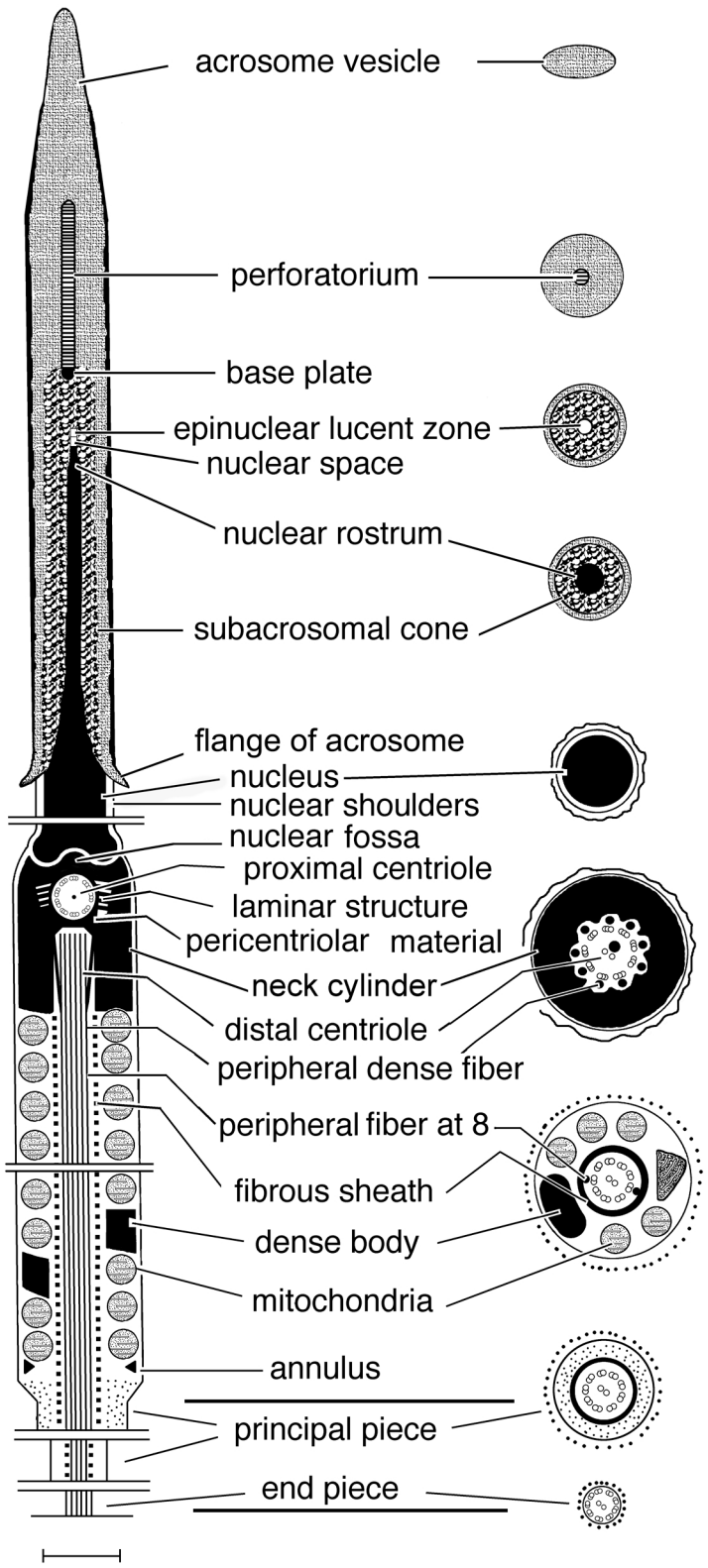
Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP (2001) *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. San Diego, CA: Academic Press.

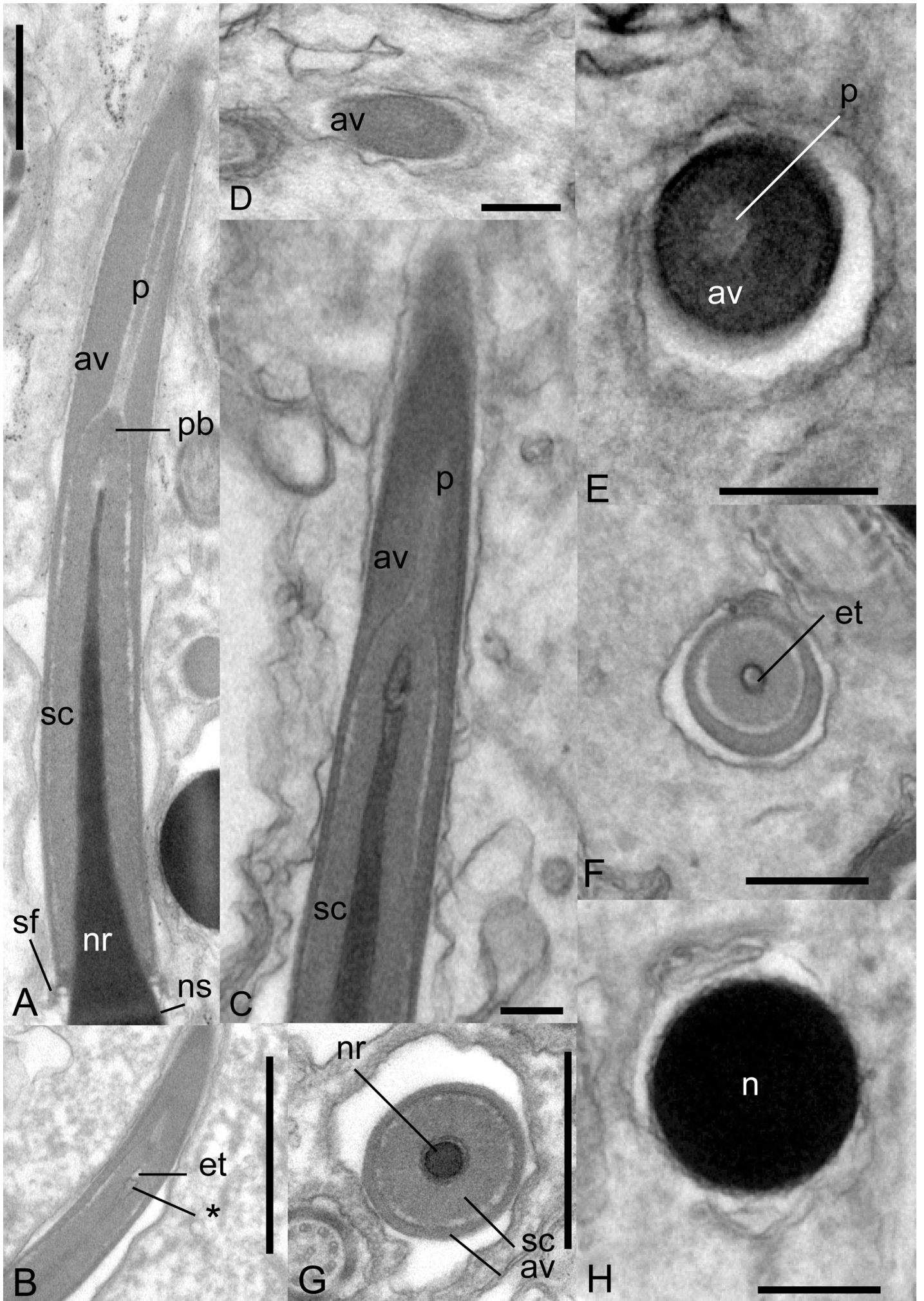
Table 1. List of qualitative characters of sperm ultrastructure and its states

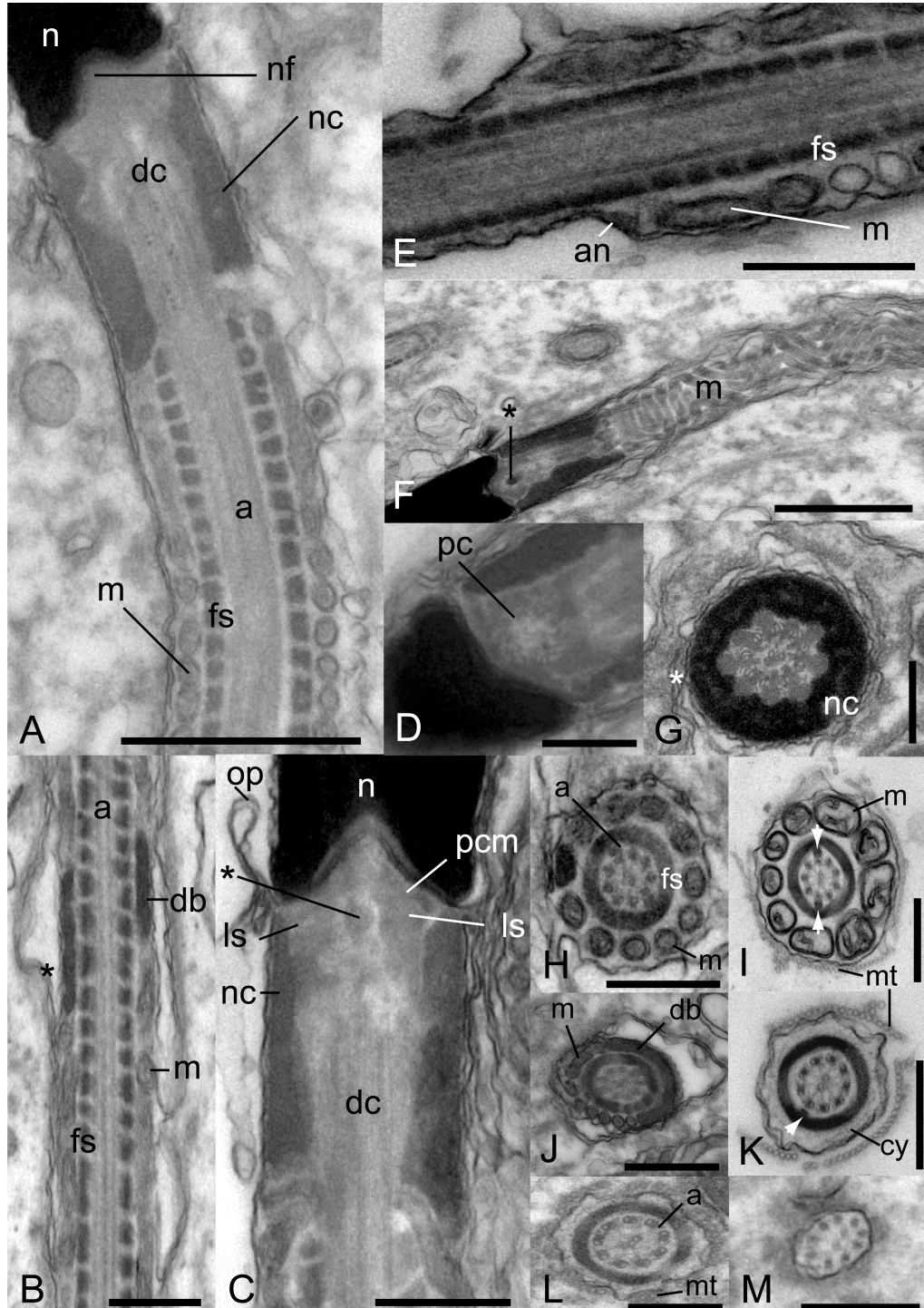
Character	States
1- Acrosome complex, ridge on acrosome surface	(0) absent; (1) present.
2- Acrosome complex, acrosome vesicle, subdivision	(0) absent; (1) present.
3- Acrosome complex, subacrosomal cone	(0) paracrystalline; (1) not paracrystalline.
4- Acrosome complex, acrosome vacuity subdivision	(0) absent; (1) present.
5- Acrosome complex, epinuclear lucent zone	(0) absent; (1) present.
6- Perforatorium, number	(0) two; (1) one.
7- Perforatorium, tip	(0) pointed; (1) rounded.
8- Perforatorium, base plate	(0) absent; (1) present; (2) not applicable.
9- Perforatorium, base plate shape	(0) knob-like; (1) stopper-like; (2) not applicable.
10- Nucleus, lacunae	(0) absent; (1) present; (2) not applicable.
11- Neck region, stratified laminar structure	(0) absent; (1) present.
12- Neck region, stratified laminar structure projection	(0) unilateral; (1) bilateral; (2) not applicable.
13- Neck region, electron dense structure inside the proximal centriole	(0) absent; (1) present.
14- Neck region, neck cylinder (dense collar)	(0) absent; (1) present.
15- Midpiece, fibers 3 and 8	(0) grossly enlarged; (1) not grossly enlarged.
16- Midpiece, mitochondrial cristae	(0) concentric; (1) linear.
17- Midpiece, mitochondria in oblique section	(0) columnar; (1) slightly curved; (2) sinuous tubes; (3) rounded.
18- Midpiece, mitochondrial shape in longitudinal section	(0) trapezoidal; (1) rounded ends; (2) columnar; (3) not applicable.
19- Midpiece, mitochondrial shape in transverse section	(0) round or ovoidal; (1) irregular; (2) trapezoidal.
20- Midpiece, dense bodies	(0) solid; (1) granular; (2) not applicable.
21- Midpiece, intermitochondrial dense bodies in transverse section	(0) separated from the fibrous sheath by mitochondria; (1) juxtaposed to fibrous sheath; (2) not applicable.
22- Midpiece, beginning of the fibrous sheath in the midpiece	(0) level of mitochondrial tier 4 (mi4); (1) level of mitochondrial tier 3 (mi3); (2) level of mitochondrial tier 2 (mi2); (3) level of mitochondrial tier 1 (mi1); (4) before of mitochondrial tier 1; (5) level of the annulus; (6) not applicable.
23- Midpiece, annulus	(0) absent; (1) present.
24- Midpiece, annulus shape	(0) scythe-shaped; (1) irregular (ovoidal, small rod, linear, triangular); (2) not applicable.
25- Principal piece, fibers 3 and 8 at the anteriormost region	(0) absent; (1) present.
26- Multilaminar membranes	(0) absent; (1) present.
27- Extracellular microtubules	(0) absent; (1) present.

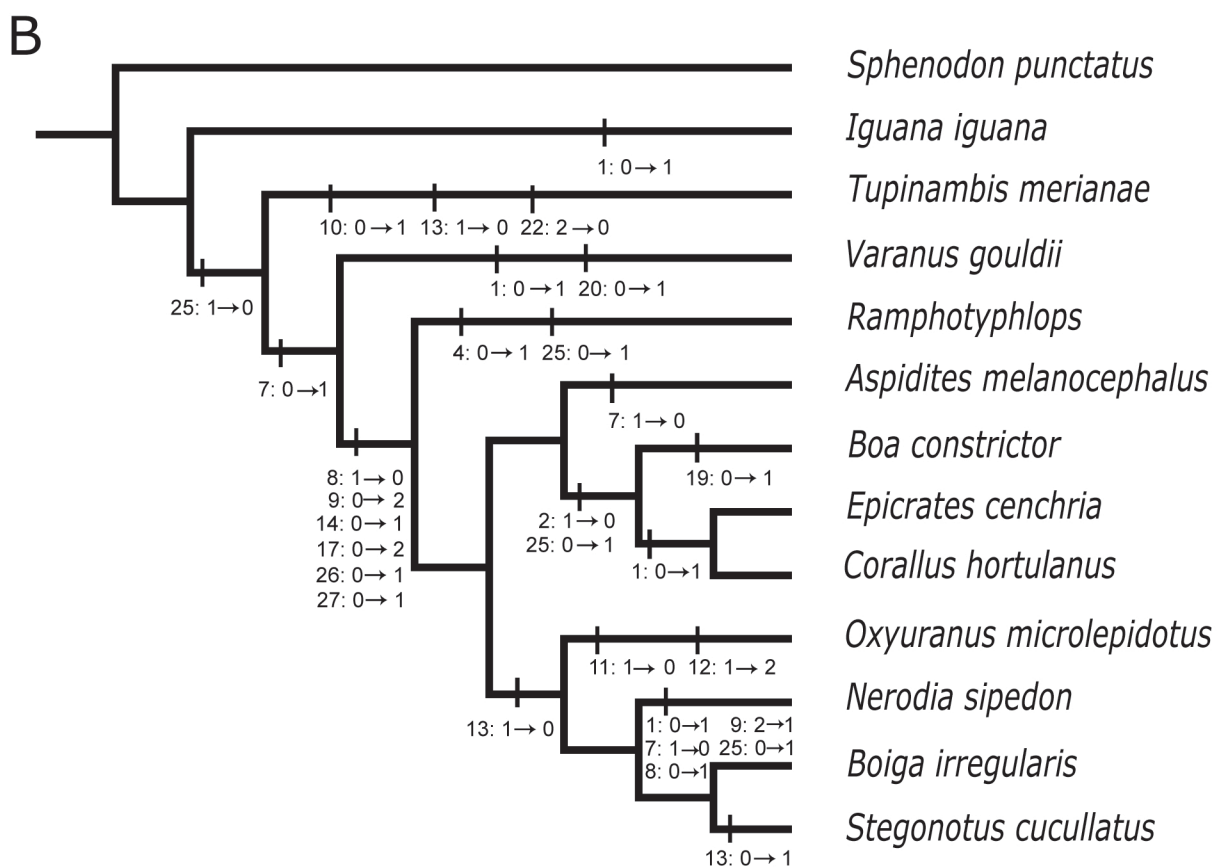
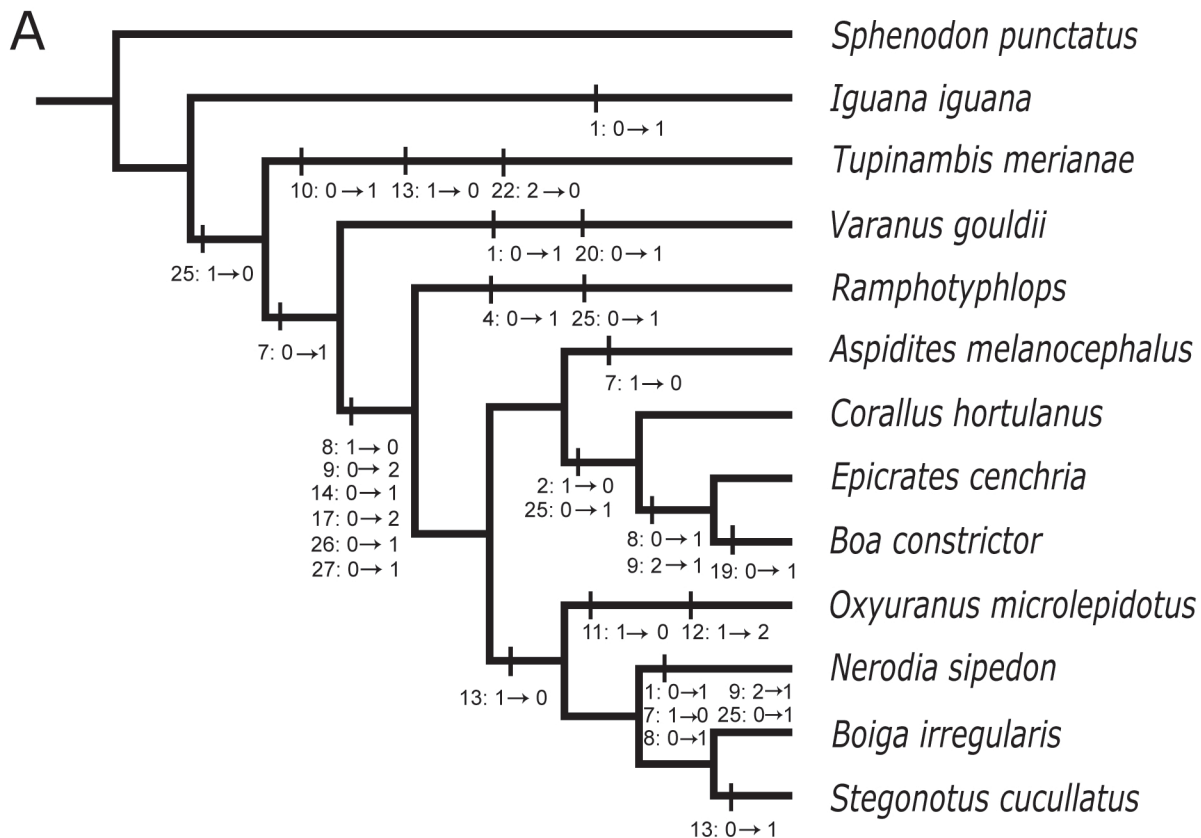
Table 2. Sperm ultrastructure character states for boids and outgroups, and their respective sources.

Taxon	1 0	2 0	2 7	Source
Boidae - <i>Boa constrictor amarali</i>	0000111110	1111112110	1311111	Present work
Boidae - <i>Corallus hortulanus</i>	1000111020	1111112100	1311111	Present work
Boidae - <i>Epicrates cenchria</i>	1000111110	1111112100	1311111	Present work
Colubridae - <i>Boiga irregularis</i>	0100111020	1101112100	1411011	(Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996)
Colubridae - <i>Nerodia sipedon</i>	11?0110110	1101112100	1311111	(Jamieson & Koehler, 1994)
Colubridae - <i>Stegonotus cucullatus</i>	0100111020	??11112100	1311011	(Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996)
Elapidae - <i>Oxyuranus microlepidotus</i>	0100111020	0201112100	1411011	(Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996)
Pythonidae - <i>Aspidites melanocephalus</i>	0100?10020	1111112100	1611011	(Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996)
Typhlopidae - <i>Ramphotyphlops</i> spp	0101?1102?	???111210?	?411111	(Harding et al., 1995)
Iguanidae - <i>Iguana iguana</i>	1100110100	1110110220	1211100	(Vieira et al., 2004)
Teiidae - <i>Tupinambis merianae</i>	0100110101	1100110010	1011000	(Tavares-Bastos et al., 2002)
Varanidae - <i>Varanus gouldii</i>	1100111100	1110110011	1211000	(Jamieson, 1995b; Oliver et al., 1996)
Sphenodontidae - <i>Sphenodon punctatus</i>	001000?222	02?0103100	1511100	(Healy & Jamieson, 1994)









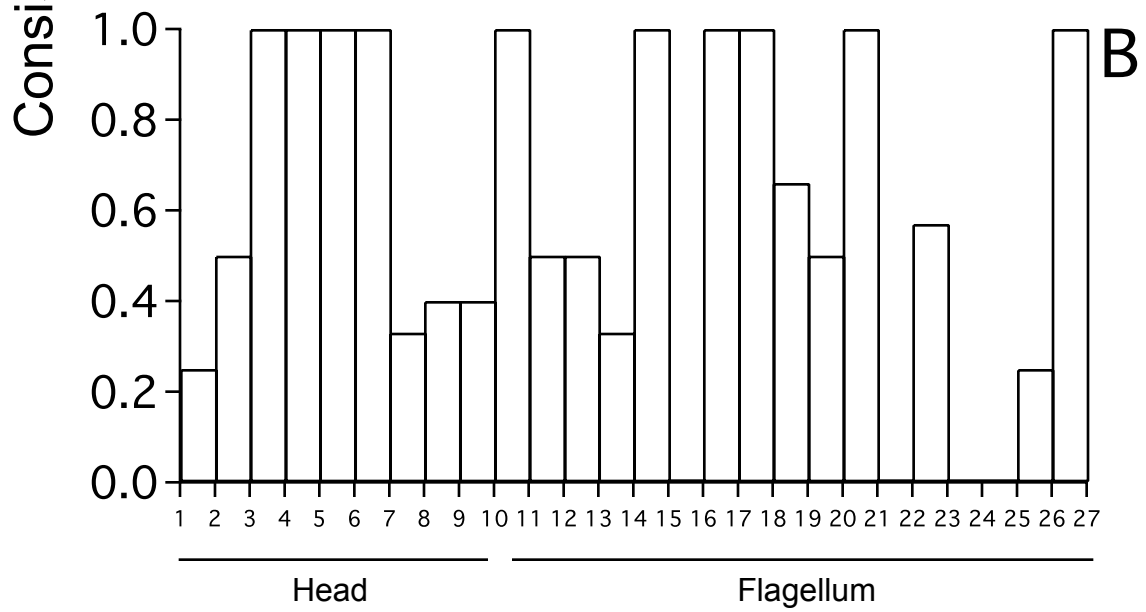
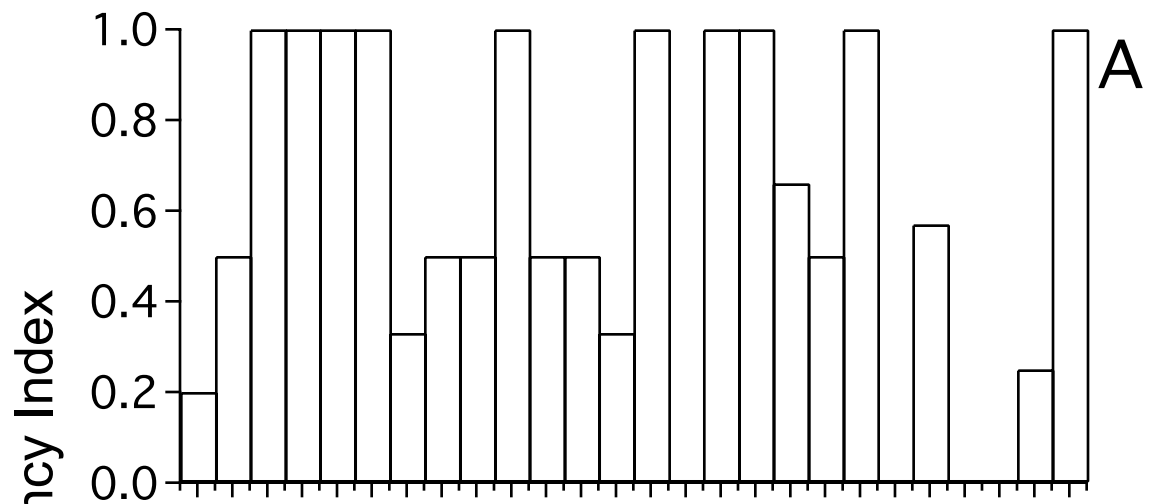


Table 3. Tree statistics of sperm head and flagellum characters, when mapped onto the morphological (Kluge, 1991) and molecular (Austin, 2000) phylogenies of Boidae.

Tree statistic by sperm region	Morphological phylogeny	Molecular phylogeny
Consistency index		
Head (n = 10)	0.70 ± 0.33	0.69 ± 0.33
Flagellum (n = 15)	0.49 ± 0.39	0.49 ± 0.39
ANOVA F	2.09	1.78
P	0.16	0.20
Number of steps		
Head (n = 10)	2.40 ± 1.51	2.50 ± 1.65
Flagellum (n = 17)	2.00 ± 1.96	2.00 ± 1.96
ANOVA F	0.30	0.44
P	0.59	0.51

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Diagram of the spermatozoon of *Boa constrictor amarali* in longitudinal section and corresponding transverse section. Scales of various components are only approximate. Scale bar 50 nm.

Figure 2. Spermatozoa of *Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, and *Corallus hortulanus*. A-H: Transmission electron micrographs of the head (acrosome complex and nucleus). A-C: Longitudinal sections through the acrosome complex. A: Longitudinal section through the acrosome of *E. cenchria* showing acrosome vesicle, subacrosomal cone, perforatorium, stopper-like perforatorium base plate, nuclear rostrum, nuclear shoulders, and flange of subacrosomal material. B: Detail of the acrosome of *E. cenchria* showing epinuclear lucent zone and nuclear space (*). C: Detail of the acrosome of *C. hortulanus* showing absence of base plate. D-H: Successive transverse sections through the head. D: Transverse section through the acrosome of *B. c. amarali* showing acrosome depressed. E-F: Transverse section through the

acrosome of *C. hortulanus* showing presence of perforatorium and epinuclear lucent zone, respectively. G: Transverse section through the acrosome of *E. cenchria* showing nuclear rostrum, subacrosomal cone and acrosome vesicle. H: Transverse section through the nucleus of *B. c. amarali*. av, acrosome vesicle; et, epinuclear lucent zone; n, nucleus; nr, nuclear rostrum; ns, nuclear shoulder; p, perforatorium; pb, perforatorium base plate; sc, subacrosomal cone; sf: flange of subacrosomal material. A-F, H: scale bar = 50 nm. G: scale bar = 100 nm.

Figure 3. Spermatozoa of *Epicrates cenchria*, *Boa constrictor amarali*, and *Corallus hortulanus*. A-M: Transmission electron micrographs of the tail (neck region, midpiece, principal piece, and endpiece). A-E: Longitudinal section of the midpiece. A: Longitudinal section of the neck region of *E. cenchria* showing nucleus, nuclear fossa, distal centriole, dense collar (neck cylinder), axoneme, fibrous sheath, and mitochondria. B: Detail of the midpiece of *C. hortulanus* showing mitochondria, dense body, fibrous sheath, and axoneme. Note the multilaminar membrane (*). C: Detail of the neck region of *B. c. amarali* showing central dense body (*), outpouching of multilaminar membranes, dense collar (neck cylinder), bilateral stratified laminar structure, pericentriolar material, and distal centriole. D: Detail of the neck region of *C. hortulanus* showing proximal centriole. E: Longitudinal section of the midpiece of *B. c. amarali* showing presence of annulus. F: Oblique section of the tail of *E. cenchria* showing central dense body (*), and mitochondrial arrangement. G-M: Successive transverse sections through the neck region, midpiece, principal piece, and end piece. G: Transverse section through the distal centriole of *E. cenchria* showing pair of central microtubules, nine triplets of microtubules, nine peripheral fibers, dense collar (neck cylinder), and presence of the multilaminar membrane (*). H-J: Transverse section through the axoneme of *C. hortulanus*, *B. c. amarali*, and *E. cenchria*, respectively, showing the fibrous sheath, mitochondria, peripheral fibers 3 and 8 (arrow), extracellular microtubules, dense body, and cytoplasm. Note in I presence of extracellular microtubules. K-L: Transverse section anterior (*B. c. amarali*) and posterior region (*E.*

cenchria) of principal piece, respectively. K: Anterior region showing peripheral fibers 3 and 8 (arrow), cytoplasm, and extracellular microtubules. L: Posterior region showing extracellular microtubules. M: Transverse section of the end piece of *C. hortulanus*. a, axoneme; an, annulus; cy, cytoplasm; db, dense body; dc, distal centriole; fs, fibrous sheath; ls, stratified laminar structure; m, mitochondria; mt, extracellular microtubules; n, nucleus; nc, neck cylinder (dense collar); nf, nuclear fossa; op, outpouching of multilaminar membranes; pc, proximal centriole; pcm, pericentriolar material. A-B, F: scale bar = 100 nm; C-E, H, M: scale bar = 50 nm; G, I-L: scale bar = 20 nm.

Figure 4. Unambiguous transformations of sperm ultrastructure characters when mapped onto (A) morphological phylogeny of boids based on Kluge (1991) and (B) molecular phylogeny of boids based on Austin (2000). Outgroup relationships based on Kluge (1993), Vidal & Hedges (2004), and Lee (2005).

Figure 5. Consistency index of 27 sperm ultrastructure characters when mapped onto the molecular (Austin, 2000) (A) and morphological (Kluge, 1991) (B) phylogenies of Boidae, according to their topological position on the spermatozoon. Character names are in Table 1.

Anexo III

Lista de caracteres

Anexo III: Lista de caracteres e seus estados.

- 1- Complexo acrossomal, protuberância unilateral da vesícula acrossômica ao nível do cone subacrossomal: (0) ausente; (1) presente.
- 2- Complexo acrossomal, espaço unilateral entre a vesícula acrossômica e o cone subacrossomal: (0) ausente; (1) presente.
- 3- Complexo acrossomal, subdivisão da vesícula acrossômica: (0) ausente; (1) presente.
- 4- Complexo acrossomal, forma na região mais anterior: (0) circular; (1) achatada.
- 5- Complexo acrossomal, cone subacrossomal: (0) paracristalino; (1) não paracristalino.
- 6- Complexo acrossomal, espaço entre vesícula acrossômica e perforatório: (0) ausente; (1) presente.
- 7- Complexo acrossomal, zona epinuclear lúcida: (0) ausente; (1) presente.
- 8- Complexo acrossomal, número de perforatório: (0) dois; (1) um.
- 9- Complexo acrossomal, ponta do perforatório: (0) afilada; (1) arredondada; (2) quadrada.
- 10- Complexo acrossomal, placa basal do perforatório: (0) ausente; (1) presente; (2) não aplicável.
- 11- Complexo acrossomal, forma da placa basal do perforatório: (0) arredondada; (1) semelhante a um quadrado; (2) não aplicável.
- 12- - Canal endonuclear: (0) ausente; (1) presente.
- 13- Núcleo, lacuna: (0) ausente; (1) presente; (2) não aplicável.

- 14- Região do pescoço, estrutura laminar estratificada: (0) ausente; (1) presente.
- 15- Região do pescoço, projeção da estrutura laminar estratificada: (0) unilateral; (1) bilateral; (2) não aplicável.
- 16- Região do pescoço, estrutura eletron-densa no centríolo proximal: (0) ausente; (1) presente.
- 17- Região do pescoço, colar denso: (0) ausente; (1) presente.
- 18- Peça intermediária, fibras 3 e 8 no meio da peça intermediária: (0) muito espessas; (1) espessas.
- 19- Peça intermediária, principal componente axial: (0) centriolar; (1) axonemal.
- 20- Peça intermediária, cristas mitocondriais: (0) concêntrica; (1) linear.
- 21- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte oblíquo: (0) colunar; (1) túbulos sinuosos; (2) arredondada, (3) túbulos retos não colunares.
- 22- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte longitudinal: (0) arredondada; (1) colunar; (2) irregular.
- 23- Peça intermediária, forma da mitocôndria em corte transversal: (0) arredondada; (1) irregular; (2) trapezóide.
- 24- Peça intermediária, aspecto dos corpos densos: (0) sólido; (1) granular.
- 25- Peça intermediária, localização dos corpos densos: (0) intramitocondrial; (1) intermitocondrial.
- 26- Peça intermediária, corpos densos em corte transversal: (0) corpos densos localizados parcialmente entre mitocôndrias e bainha fibrosa; (1) corpos densos e mitocôndrias justapostos à bainha fibrosa; (2) não aplicável.

- 27- Peça intermediária, bainha fibrosa: (0) ausente na peça intermediária; (1) presente na peça intermediária.
- 28- Região do pescoço, centríolo distal: (0) circundado apenas por colar denso; (1) circundado por colar denso e mitocôndrias; (2) circundado por mitocôndrias e/ou corpos densos.
- 29- Peça intermediária, início da bainha fibrosa: (0) nível da quarta mitocôndria; (1) nível da segunda mitocôndria; (2) nível da primeira mitocôndria; (3) antes da primeira mitocôndria; (4) nível do ânulos; (5) não aplicável
- 30- - Peça intermediária, ânulos: (0) ausente; (1) presente.
- 31- Peça intermediária, forma do ânulos: (0) triangular, (1) linear; (2) arredondado; (3) trapezóide.
- 32- Peça principal, fibras 3 e 8 no início da peça principal: (0) ausente; (1) presente.
- 33- Membranas multilaminares: (0) ausente; (1) presente.
- 34- Microtúbulos extracelulares: (0) ausente; (1) presente.
- 35- Forame pré-maxilar palatal: (0) presente; (1) ausente.
- 36- Forame pré-maxilar lateral: (0) presente; (1) ausente.
- 37- Contato entre a pré-maxila e maxila (0) sutural; (1) não sutural.
- 38- Protuberância alveolar da maxila: (0) contínuo; (1) voltado para cima na extremidade anterior.
- 39- Processo dorsal da maxila: (0) no ponto médio da maxila ou à frente; (1) atrás do ponto médio da maxila.

- 40- Processo dorsal da maxila estende-se: (0) dorsomedialmente; (1) dorsolateralmente.
- 41- Processo posterior da maxila: (0) longo; (1) curto.
- 42- Lacrimal: (0) presente; (1) ausente.
- 43- Lacrimal: (0) separado do pré-frontal; (1) fundido ao o pré-frontal.
- 44- Forâme lacrimal: (0) único; (1) duplo.
- 45- Forâme lacrimal: (0) ao menos parcialmente circundado pelos elementos faciais; (1) inteiramente dentro do pré-frontal.
- 46- Jugal: (0) presente; (1) ausente.
- 47- Jugal: (0) não estendido anteriormente até o ponto médio da órbita; (1) estendido anteriormente até o ponto médio da órbita.
- 48- Nasais: (0) pareados; (1) fundidos.
- 49- Contato entre o nasal e pré-frontal: (0) presente; (1) ausente.
- 50- Região nasal: (0) não retraído; (1) ligeiramente retraído; (2) muito retraído.
- 51- Margem orbital do pré-frontal: (0) lisa; (1) rugosa.
- 52- Frontal : (0) único; (1) pareado.
- 53- Frontal: (0) com a margem lateral contínua ou fracamente côncava; (1) com a margem lateral muito côncava.

54- Borda frontal circundada pelo nasal: (0) ausente; (1) presente.

55- Delineação superficial da sutura frontoparietal e nitidez da interdigitação: (0) nitidamente interdigitada; (1) essencialmente uma linha transversa; (2) frontal invadindo o parietal; (3) frontais posterolateralmente circundados pelo parietal

56- Frontal: (0) penetra na margem dorsal da órbita; (1) excluído da margem dorsal da órbita.

57- Pós-frontal: (0) longo; (1) curto; (2) ausente.

58- Pós-frontal no adulto: (0) separado; (1) fundido ao pós-orbital.

59- Pós-orbital medialmente: (0) não bifurcado; (1) bifurcado.

60- Ossificação palpebral: (0) ausente; (1) presente.

61- Pós-orbital: (0) presente; (1) ausente.

62- Processo ventral do pós-orbital: (0) longo; (1) curto.

63- Margem posterior da órbita: (0) completa; (1) com um pequeno espaço; (2) com um grande espaço.

64- Parietal (is): (0) pareados; (1) fundidos.

65- Aba do parietal: (0) presente; (1) ausente.

66- Parietal: (0) metade do comprimento do crânio ou mais curto do que a metade do comprimento do crânio; (1) mais longo do que a metade do comprimento do crânio.

- 67- Forame pineal: (0) presente; (1) ausente.
- 68- Forame pineal: (0) dentro do parietal; (1) na sutura do frontoparietal; (2) dentro do frontal.
- 69- Origem dos músculos adutores da mandíbula: (0) restrito à superfície ventral do parietal; (1) invade a superfície dorsal do parietal.
- 70- Supra-occipital: (0) exposto na vista dorsal pelo parietal; (1) escondido na vista dorsal pelo parietal.
- 71- Processo posterolateral do parietal: (0) nítido; (1) curto ou ausente.
- 72- Arco supratemporal: (0) completo; (1) incompleto.
- 73- Jugal: (0) sem contato com o squamosal; (1) em contato com o squamosal.
- 74- Squamosal: (0) presente; (1) ausente.
- 75- Processo dorsal do squamosal: (0) presente; (1) ausente.
- 76- Fenestra supratemporal: (1) não restringida pelo pós-orbital; (1) restringida pelo pós-orbital.
- 77- Fenestra supratemporal: (0) não limitada pelo pós-frontal; (1) limitada pelo pós-frontal.
- 78- Supratemporal. (0) ausente; (1) presente.
- 79- Supratemporal: (0) na superfície dorsolateral do parietal; (1) na superfície ventrolateral do parietal.
- 80- Supratemporal: (0) confinado no teto do crânio; (1) forma parte do processo para-occipital e/ou caixa craniana.

- 81- Supratemporal: (0) menos que a metade da largura máxima do crânio; (1) ao menos a metade da largura máxima do crânio.
- 82- Quadrato: (0) monimostílico; (1) estreptostílico e suspenso do supratemporal, squamosal, e opistólico; (2) suspenso principalmente do supratemporal; (3) suspenso principalmente do opistólico; (4) suspenso principalmente do esquamosal.
- 83- Quadrato: (0) muito inclinado anteriormente, quase horizontal; (1) inclinado ligeiramente anteroventralmente; (2) posicionado verticalmente; (3) inclinado posteroventralmente.
- 84- Crista timpânica no quadrato: (0) muito desenvolvida; (1) pouco desenvolvida; (2) ausente.
- 85- Quadrato: (0) com rotação anteromedial; (1) sem rotação anteromedial.
- 86- Fenestra orbitonasal: (0) larga; (1) estreita.
- 87- Processo ventromedial da parte final do frontal: (0) livre ventralmente; (1) adjacentes ou suturado um ao outro abaixo do trato olfatório; (2) em contato com o parabasesfenoide.
- 88- Orbitoesfenóide: (0) ausente; (1) presente.
- 89- Crescimento em profundidade do parietal: (0) ausente ou curto; (1) proeminente.
- 90- Crescimento em profundidade do parietal: (0) pontudo ventralmente; (1) semelhante a uma lâmina.
- 91- Processo alar no proótico: (0) ausente; (1) presente.
- 92- Crescimento em profundidade do parietal: (0) livre ventralmente; (1) em contato com o parabasisfenóide; (2) contato com o orbitoesfenóide.

- 93- Forame ótico: (0) não circundado por osso; (1) circundado pelo frontal; (2) circundado pelo orbitoesfenóide; (3) circundado pelo frontal e parietal; (4) circundado pelo frontal, parietal, e paraesfenóide.
- 94- Cavidade anterior do cérebro: (0) assoalho não ósseo; (1) assoalho composto pelo ortoesfenóide; (2) base composta pelo processo cultriforme largo do paraesfenóide.
- 95- Forame trigeminal: (0) aberto anteriormente; (1) circundado anteriormente pelo parietal; (2) circundado anteriormente pelo orbitoesfenóide e parabasisfenóide.
- 96- Processo alar do proótico: (0) direcionado dorsalmente; (1) direcionado anterodorsalmente.
- 97- Crista proótica: (0) bem desenvolvida; (1) reduzida.
- 98- Inclusão da veia lateral da cabeça no canal formado pela continuação anteroventral da crista proótica: (0) incluída ; (1) não incluída.
- 99- Forame hipoglossal: (0) bem separado do forame vago; (1) fechado ou confluyente com o forame vago.
- 100- Recesso occipital lateralmente: (0) aberto; (1) fechado.
- 101- Cápsula ótica lateralmente: (0) não expandida; (1) expandida.
- 102- Columela: (0) pouco desenvolvida, base pequena; (1) robusta, base grande
- 103- Base estapedial (0) não circundada (1) circundada por abas ósseas projetadas da superfície lateral da caixa craniana.
- 104- Processo basispterigóide: (0) longo; (1) curto.

105- Faceta articular do processo basispterigóide: (0) subcircular; (1) anteroposteriormente alongada.

106- Localização da tubera basal: (0) posterior; (1) anterior.

107- Abertura posterior do canal Vidian: (0) dentro do basisfenóide; (1) na sutura do basisfenóide e proótico; (2) entre o proótico e a ossificação epifiseal na região da tubera basal.

108- Abertura posterior do canal Vidian: (0) situada enfrente do final anterior do basisfenóide; (1) situada próximo no final posterior do basisfenóide.

109- Crista tuberalis: (0) pouco desenvolvida; (1) alargada

110- Fossa pós-temporal: (0) presente; (1) reduzida; (2) ausente.

111- Supraoccipital: (0) situado ventralmente ou posteroventralmente ao parietal; (1) situado no mesmo nível do parietal.

112- Exoccipital no adulto: (0) separado do opistótico; (1) fundido ao opistótico

113- Côndilo occipital: (0) único; (1) duplo.

114- Septomaxila: (0) extensivamente suturada à maxila; (1) não suturada à maxila.

115- Aba medial na septomaxila: (0) curta; (1) longa; (2) não aplicável.

116- Cobertura do órgão de Jacobson pela septomaxila: (0) achatado; (1) abaulado.

117- Abertura do órgão de Jacobson: (0) confluyente com a coana; (1) separado da coana pelo vômer e maxila; (2) separado pelo vômer e

septomaxila.

118- Vômer : (0) pareados; (1) fundidos.

119- Vômer : (0) sem contato extensivo com a maxila atrás do órgão de Jacobson; (0) em contato extensivo com a maxila atrás do órgão de Jacobson.

120- Vômer: (0) menos que a metade do comprimento da maxila; (1) ao menos a metade do comprimento da maxila.

121- Vômer: (0) em forma de lâmina; (1) arredondado.

122- Vômer: (0) anterior ou anteromedial ao palatino; (1) inteiramente medial ao palatino.

123- Palato secundário: (0) presente; (1) ausente.

124- Contato entre palatino e vômer: (0) curto; (1) longo.

125- Contato entre o palatino e o vômer: (0) imóvel; (1) móvel.

126- Palatino: (0) tão longo quanto o vômer; (1) metade do comprimento do vômer; (2) curto anteroposteriormente (muito mais curto que o vômer); (3) longo anteroposteriormente (muito mais longo que o vômer)

127- Espaço interpterigóide: (0) estendendo-se entre os palatinos; (1) não estendendo-se entre os palatinos.

128- Palatino: (0) sem processo medial distinto; (1) com processo medial distinto.

129- Sulco coanal no palatino: (0) curto ou ausente; (1) longo.

130- Contato entre ectopterigóide e palatino: (0) ausente; (1) presente.

131- Fenestra suborbital: (0) grande; (1) pequena; (2) ausente.

132- Recesso piriforme: (0) aberto e largo; (1) aberto e estreito; (2) fechado pelo parasfenóide.

133- Contato ente o pterigóide e vômer: (0) presente; (1) ausente.

134- Pterigóide: (0) com depressão triangular na face ventral, estendendo-se da fenestra suborbital à articulação palatobasal; (1) sem depressão triangular na face ventral, estendendo-se da fenestra suborbital à articulação palatobasal.

135- Processo anterior (palatino) do pterigóide: (0) gradualmente une-se ao processo transversal (ectopterigóide); (1) é distinto do processo transversal (ectopterigóide).

136- Processo anterolateral do pterigóide estendendo-se ao longo da margem lateral do palatino: (0) ausente; (1) presente.

137- Epipterigóide: (0) presente; (1) ausente.

138- Sínfise mandibular: (0) rígida; (1) móvel.

139- Forame mental no dentário: (0) três ou mais; (1) dois ou menos.

140- Dental na vista lateral: (0) com margem dorsal (alveolar) contínua; (1) com margem dorsal (alveolar) côncava.

141- Processo posterodorsal do dentário estendendo-se na superfície lateral do processo coronóide: (0) grande; (1) pequeno; (2) ausente.

142- Canal de Meckel: (0) sulco aberto; (1) junto à borda do dentário em contato sutural; (2) junto à borda do dentário totalmente fundidos.

- 143- Extremidade anterior do canal de Meckel: (0) na margem anteroventral do dentário; (1) na superfície medial do dentário.
- 144- Septo intramandibular do dentário: (0) não aproxima-se da posição mais posterior do dente; (1) aproxima-se ou atinge a região mais posterior da posição do dente.
- 145- Saliência subdental: (0) grande; (1) pequena; (2) ausente.
- 146- Margem posterior da superfície lateral do dentário: (0) sem orifício; (1) com orifício raso; (2) com orifício profundo.
- 147- Principal suporte do dentário: (0) pelo coronóide, surangular e pré-articular; (1) pelo pré-articular; (2) pelo surangular.
- 148- Esplênial: (0) grande; (1) pequeno; (2) ausente.
- 149- Esplênial: (0) sobrepõe-se com o angular; (1) contato abrupto com o angular, onde o esplênial abriga o angular; (2) contato abrupto com o angular, onde o esplênial é abrigado pelo angular.
- 150- Extremidade anterior do esplênial: (0) na margem ventral do dentário; (1) na superfície medial do dentário.
- 151- Contato entre o esplênial e o dentário: (0) longo; (1) reduzido.
- 152- Processo anteromedial do coronóide: (0) longo; (1) curto.
- 153- Processo anterolateral do coronóide: (0) ausente; (1) presente.
- 154- Coronóide: (0) contacta o esplênial; (1) não contacta o esplênial.
- 155- Margem ventral do coronóide: (0) contínua e convexa; (10) côncava.

156- Osso composto formado pelo surangular, pré-articular, e articular: (0) ausente; (1) presente.

157- Surangular: (0) estende-se medialmente à superfície do dentário terminado em um ponto; (1) estende-se medialmente à superfície do dentário terminando com um final **cego**; (2) termina com um final cego mas não estende-se até a parte medial do dentário; (3) estende-se até a superfície lateral do dentário e termina em um ponto.

158- Surangular: (0) sem aba dorsal sobrepondo a parte posterior do processo coronóide; (1) com aba dorsal sobrepondo a parte posterior do processo coronóide.

159- Angular: (0) presente; (1) ausente .

160- Angular: (0) com larga exposição na face medial da mandíbula; (1) com estreita ou sem exposição na face medial da mandíbula.

161- Processo angular digitiforme: (0) presente; (1) ausente.

162- Pré-articular: (0) não estende-se anteriormente além da (s) posição (ões) de dente do dentário; (1) estende-se anteriormente além da (s) posição (ões) de dente do dentário.

163- Crista pré-articular: (0) ausente; (1) moderadamente bem desenvolvida; (2) proeminente.

164- Fossa adutora: (0) dorsomedial; (1) dorsal.

165- Fossa adutora: (0) estreita transversalmente; (1) inflada transversalmente.

166- Articular: (0) fundido com o pré-articular e surangular; (1) fundido com o pré-articular; (2) separado.

- 167- Processo retroarticular: (0) alinhado com restante da mandíbula; (1) contrabalanceado medialmente.
- 168- Processo retroarticular: (0) estende-se posteriormente de forma contínua; (1) estende-se posteriomedialmente; (2) reduzido e nodoso.
- 169- Superfície dorsal do processo retroarticular: (0) com fossa ou sulco; (1) côncava lisa.
- 170- Margem dorsomedial do processo retroarticular: (0) lisa; (1) com tubérculo distinto ou aba.
- 171- Processo retroarticular: (0) estreito distalmente; (1) largo distalmente.
- 172- Processo retroarticular: (0) não torcido posteriormente; (1) torcido posteriormente.
- 173- Implantação dentária: (0) acrodonte; (1) pleurodonte **labial**; (2) pleurodonte (totalmente) modificado; (3) dente incluso no saco alveolar.
- 174- Plicidentina: (0) ausente; (1) presente.
- 175- Coroa dentária: (0) sem espaço; (1) separada por largo espaço.
- 176- Reposição dentária posicionada: (0) lingual à dente funcional; (1) posterolingual à dente funcional; (2) ausente.
- 177- Pontos de reabsorção: (0) grande, estendendo até a coroa dentária; (1) pequeno, restrito ao osso do anexo a base do dente; (2) grande, restrito à altura da base do dente composto de anexo ósseo.
- 178- Reposição dentária: (0) emerge no lado direito; (1) emerge horizontalmente.
- 179- Dente da pré-maxila: (0) cinco ou mais; (1) quatro ou menos.
- 180- Dente medial da pré-maxila: (0) ausente; (1) presente.

181- Dente medial da pré-maxila: (0) não espesso; (1) espesso.

182- Dente na pré-maxila: (0) similar no tamanho ao dente maxilar anterior; (1) distintamente menor do que o dente maxilar anterior.

183- Posições dos dentes maxilares: (0) treze ou mais; (1) doze a nove; (2) oito ou menos.

184- Posições dos dentes (0) treze ou mais; (1) doze à nove; (2) oito ou menos.

185- Dente no palatino: (0) presente; (1) ausente.

186- Dente no palatino: (0) pequeno; (1) similar ao tamanho do dente marginal.

187- Dente no pterigóide: (0) presente; (1) ausente.

188- Dente do ovo: (0) único; (1) pareado.

189- Centra: (0) não constringido; (1) ligeiramente constringido; (2) muito constringido; (3) enfrente ao côndilo.

190- Côndilos vertebrais: (0) posterior; (1) ligeiramente dorsal; (2) dorsal.

191- Forma dos côndilos vertebrais na região média dorsal: (0) oval; (1) arredondado.

192- Centra: (0) notocordal; (1) não notocordal.

193- Processos espinhais: (0) processo longo; (1) protuberância pequena.

194- Zigosfeno-zigantrum: (0) ausente; (1) presente com a superfície posicionada latero-dorsalmente; (2) presente com superfície posicionada ventrolateralmente.

195- Intercentra dorsal: (0) presente; (1) ausente.

196- Vértébras pré-sacrais: (0) 22 ou menos; (1) 23 a 25; (2) 26; (3) 27 A 50; (4) 50 A 119; (5) 120 ou mais.

197- Vértébras cervicais: (0) sete ou menos; (1) oito; (2) nove ou mais.

198- Aba dorsoposterior no arco neural do atlas. (0) presente; (1) ausente.

199- Intercentral cervical: (0) não suturado nem fundido ao centrum precedente; (1) suturado ao centrum precedente; (2) fundido ao centrum precedente.

200- Intercentra cervical: (0) nem suturado nem fundido ao centrum seguinte; (1) suturado ao centrum seguinte; (2) fundido ao centrum seguinte.

201- Processo transverso caudal: (0) único em vários caudais; (1) duplo em vários caudais.

202- Processo transverso caudal: (0) duas pontas convergem distalmente; (1) diverge distalmente.

203- Processo transverso caudal: (0) projetado lateralmente ou posterolateralmente; (1) projetado anterolateralmente.

204- Septo de autotomia caudal: (0) presente; (1) ausente.

205- Septo de autotomia caudal: (0) anterior ou dentro do processo transverso; (1) posterior ao processo transverso.

206- Pedestais na vértebra caudal para “chevron” (0) pouco desenvolvido; (1) proeminente.

207- Articulação do “chevron”: (0) com centra caudal; (1) fundida à centra caudal.

208- “Chevron” caudal: (0) posicionado na margem posteroventral do centrum; (1) posicionado em frente à margem posteroventral do centrum.

- 209- Primeira costela: (0) na terceira vértebra cervical; (1) na quarta vértebra cervical.
- 210- Extremidade final da costela: (0) sem pseudotubérculo anteroventral; (1) com pseudotubérculo anteroventral.
- 211- Extremidade proximal da costela: (0) sem pseudotubérculo posteroventral; (1) com pseudotubérculo posteroventral.
- 212- Linfapófise: (0) ausente; (1) presente.
- 213- Scapulocoracóide: (0) grande; (1) reduzido; (2) ausente.
- 214- Emarginações na borda anterodorsal da escápula: (0) ausente; (1) presente.
- 215- Emarginação na coracóide anterior: (0) ausente; (1) presente.
- 216- Emarginação na coracóide posterior: (0) ausente; (1) presente.
- 217- Clavícula: (0) presente; (1) ausente.
- 218- Clavícula: (0) segue a margem anterior do escapulo-coracóide; (1) curva anteriormente a partir do escapulo-coracóide.
- 219- Clavícula: (0) arredondada; (1) expandida proximalmente com a lacuna proximal ou fenestra.
- 220- Interclavícula: (0) presente; (1) ausente.
- 221- Interclavícula: (0) em forma de cruz; (1) arredondado simples.
- 222- Processo anterior da interclavícula: (0) curto ou ausente; (1) longo.

223- Esterno ossificado: (0) presente; (1) ausente.

224- Fontanela esterna: (0) ausente; (1) presente

225- Pares de conexões das costelas ao esterno: (0) cinco; (1) quatro; (2) três; (3) dois ou menos.

226- inscrição pós-xifisternal das costelas: (0) não unidos; (1) um ou mais pares unidos ao longo da linha média ventral.

227- Membros anteriores: (0) grande; (1) pequeno ou ausente.

228- Forame ectepicondilar do úmero: (0) presente; (1) ausente.

229- Pelve: (0) grande; (1) reduzida; (2) ausente.

230- Elementos pélvicos: (0) co-ossificado em um único osso; (1) muito suturados um ao outro; (2) pouco unidos em um contato não sutural.

231- Lâmina sacral do ílio: (0) com processo anterior; (1) sem processo anterior.

232- Tubérculo púbico: (0) na extremidade posterodorsal da púbis; (2) na haste da púbis.

233- Membros posteriores: (0) bem desenvolvidos; (1) rudimentares ou ausentes.

234- Fêmur: (0) frágil; (1) forte.

235- Astragalos no calcâneo: (0) fundidos no adulto; (1) separados no adulto.

236- Osteodermes dorsais do corpo: (1) ausente; (1) presente.

237- Osteodermes ventrais do corpo: (0) ausente; (1) presente.

238- Osteodermes craniais separáveis: (0) ausente; (1) presente na periferia do teto do crânio; (2) presente em toda teto do crânio.

239- Osteodermes craniais separáveis: (0) poucas e grandes; (1) várias e pequenas.

240- Osteodermes craniais separáveis: (0) firmemente conectadas ao teto do crânio; (1) fracamente conectadas ao teto do crânio.

241- Rugosidades no teto do crânio formado pela sobreposição de escamas cefálicas: (0) ausente; (1) com padrão vermiculado; (2) sem padrão vermiculado.

242- Ossículos esclerais: (0) presentes; (1) ausentes.

243- Ossículos esclerais: (0) 15 ou mais; (1) 14; (2) 13 ou menos.

244- Forma dos ossículos esclerais: (0) complexo e irregular; (1) quadrado.

245- Segundo epibranchial no esqueleto hióide: (0) presente; (1) ausente.

246- Segundo ceratobranchial no esqueleto hióide: (0) presente; (1) ausente.

247- Epífises no crânio e esqueleto axial: (0) presente; (1) ausente.

248- Epífises: (0) ao mesmo tempo ou depois da fusão dos elementos do crânio; (1) antes da fusão dos elementos do crânio.

249- Ossos pós-cloacais: (0) ausente; (1) presente.

250- Abas mediais ventrais do frontal, separado do trato olfatório: (0) ausente; (1) presente.

251- Processo ascendente cartilagosos do supraoccipital: (0) presente; (1) ausente.

252- Processo dentífero posterior do dentário alongado: (0) ausente; (1) presente.

253- Pelve (quando presente): (0) externa à caixa torácica, contato sacral geralmente presente; (1) localiza-se dentro do caixa torácica, contato sacral ausente.

254- Fêmur: (0) bem desenvolvido; (1) pequeno; (2) vestigial ou ausente.

255- Tíbia, fibula, astragalus, e calcâneo: (0) presente; (1) ausente.

256- Palatino: (0) pequeno e largo; (1) estreito e longo.

257- Processo anterior sustentador de dente do palatino: (0) ausente; (1) presente.

258- Processo dentífero: (0) ausente; (1) presente.

259- Processo supra-estapedial do quadrato: (0) presente; (1) ausente.

260- 1284: fragmento ribossomal 12S.

1285- 2557: fragmento ribossomal 16S.

2558-3313: fragmento nucleart C-mos

Anexo IV: Matriz de datos

	2600	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690
<i>Liotyphlops</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Typhlops</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Ramphotyphlops</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Leptotyphlops</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Anilius scytale</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Acrochordus</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Cylindrophis ruffus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Tropidophis</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Python</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Aspidites melanocephalus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Boa constrictor</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Corallus hortulanus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Epicrates</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Micrurus</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Bothrops</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Boiga</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Nerodia sipedon</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Stegonotus cucullatus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Oxyrhopus</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Xenopholis scalaris</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Lialis burtonis</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Tupinambis</i> spp	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Varanus gouldii</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Heteronotia binocci</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Iguana iguana</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Sphenodon punctatus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Amphisbaena alba</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Pachyrhachis problematicus</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A
<i>Dimisysia patagonica</i>	T	G	T	C	C	T	G	C	C	A

	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
<i>Liotyphlops</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Typhlops</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Ramphotyphlops</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Leptotyphlops</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Anilius scytale</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Acrochordus</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Cylindrophis ruffus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Tropidophis</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Python</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Aspidites melanocephalus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Boa constrictor</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Corallus hortulanus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Epicrates</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Micrurus</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Bothrops</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Boiga</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Nerodia sipedon</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Stegonotus cucullatus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Oxyrhopus</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Xenopholis scalaris</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Lialis burtonis</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Tupinambis</i> spp	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Varanus gouldii</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Heteronotia binocci</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Iguana iguana</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Sphenodon punctatus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Amphisbaena alba</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Pachyrhachis problematicus</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G
<i>Dimisysia patagonica</i>	G	T	C	T	G	C	T	C	C	T	G

