

Gabrieli Santos de Araújo

Biologia reprodutiva das espécies de *Chironius*
(Serpentes, Colubridae)

São José do Rio Preto

2023

Gabrieli Santos de Araújo

Biologia reprodutiva das espécies de *Chironius*
(Serpentes, Colubridae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Selma Maria de Almeida Santos

São José do Rio Preto

A663b Araújo, Gabrieli Santos de
Biologia reprodutiva das espécies de Chironius (Serpentes,
Colubridae) / Gabrieli Santos de Araújo. -- São José do Rio Preto,
2024
125 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientadora: Selma Maria Almeida-Santos

1. Zoologia. 2. Reprodução. 3. História Natural. 4. Morfologia
animal. 5. Histologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabrieli Santos de Araújo

**Biologia reprodutiva das espécies de *Chironius*
(Serpentes, Colubridae)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Comissão Examinadora

Prof.^a Dr.^a Selma Maria de Almeida Santos (Orientadora)
Instituto Butantan – São Paulo
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Letícia Ruiz Sueiro
Escola Superior do Instituto Butantan – São Paulo

Prof. Dr. Otavio Augusto Vuolo Marques
Instituto Butantan – São Paulo

São Paulo

12 de dezembro de 2023

Dedico este trabalho ao crescimento pessoal que esta jornada acadêmica me proporcionou, as emoções fortemente vividas e os desafios superados que resultaram em uma melhor versão de mim mesma.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O qual agradeço imensamente, pois sem financiamento, essa pesquisa científica encontraria diversas dificuldades e não seria possível desenvolvê-la.

À UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade do IBILCE (São José do Rio Preto). Ao Coordenador do Programa, Antonio Carlos Lofego, e todos os demais funcionários que me auxiliaram ao longo destes dois anos. À concessão de auxílios diários para realização de viagens para coleta de dados e participação em eventos científicos.

Aos curadores e funcionários das coleções herpetológicas, Dr. Felipe Grazziotin e Valdir Germano (IBSPCR/LCZ), Dr. Luis Felipe Toledo, Paulo Manzani e Karina Elisiário (ZUEC), Dr. Renato Feio (MZUFV), Dr. Paulo Passos, Dra. Manoela Cardoso e Dr. Pedro Pinna (MNRJ), Dr. Francisco Neto e Dra. Liliana Piatti (ZUFMS), Dr. Júlio Leite (MHNCI), Dr. Thiago Soares e Francieli Pugal (MBML), Dr. Henrique Costa (CHUFJF), Dr. Santiago Fisher, Dr. Carlos Lucena e Juliano Romanzini (MCP), Dra. Noeli Zanella (CRUPF), Dra. Luciana Nascimento (MCNR), Dr. Pedro Nunes e Dr. Pedro Simões (CHRUPE), MSc. Giselle Cotta e Dra. Flávia Resende (FUNED), pelo apoio e acolhimento durante as visitas realizadas e/ou logística para envio dos exemplares sob seus cuidados.

À Dra. Marta Maria Antoniazzi, Dr. Carlos Jared e Dra. Adriana Neves pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Biologia Estrutural e Laboratório de Genética para o preparo das lâminas histológicas e fotografias microscópicas. Aos técnicos Pedro Fontana, Beatriz Mauricio, Luciana Sato e Dener Souza por todo apoio durante as atividades realizadas.

À minha orientadora, Dra. Selma Maria de Almeida-Santos, por me receber de forma tão acolhedora desde a iniciação científica, por acreditar em minha capacidade, pelas longas conversas cheias de conhecimento e carinho pela linha de pesquisa. Por ser uma grande referência como pesquisadora e mulher. Por me transmitir ainda mais amor pela ciência.

Ao Dr. Otavio Marques e Dra. Letícia Sueiro por aceitarem participar da banca da minha defesa e pelas considerações relevantes feitas. Aos Doutores Ricardo Sawaya e Henrique Braz por participarem como membros suplentes. Aos Doutores Alexandre Missassi e Luis Miguel Lobo pelas revisões e sugestões para com a dissertação durante a fase de qualificação.

À Dra. Serena Najara Migliore e Dr. Luis Miguel Lobo pelos ensinamentos quanto a dissecação, coleta e análise de dados ainda na iniciação científica, além da amizade que criamos ao longo desses anos. À Karina Silva por me ensinar a técnica de sutura dos animais após a dissecação e coleta, e assim permitir uma boa conservação dos órgãos internos dos mesmos.

À todos os amigos do LEEV/GERES!! À Érica, Rafael, Gabi Ramos, Isa, Fabiano, Lígia, Eletra, Tati, Rebeca e Bruno por todas as conversas úteis e inúteis, momentos de descontrações, muito apoio “técnico” e emocional. Que sorte a minha ter feito tantos amigos que levarei pra vida.

Em especial agradeço ao Renan, meu querido amigo de longa data, companheiro de viagens e de todas as atividades da graduação/pós-graduação, desde as coletas de dados até as revisões da dissertação. Agradeço a parceria em todos os momentos, bons e ruins, fáceis e difíceis. A nossa amizade tornou este processo muito mais leve e mais bem vivido. Obrigada de coração!

À Érica, Tyelli e Luan Lucas pela hospedagem durante as viagens para eventos da pós-graduação e coleta de dados, pelos passeios que fizemos, comilanças e tudo mais.

Aos técnicos do LEEV, Adriano, Bruno, Cristiene, Cinthia, Kelly, Márcia e Poli, por estarem dispostos a ajudar os alunos quando necessário.

Aos funcionários do LEEV, Regina, Dona Vera, Dona Maria, Darina, Dona Marta, Sr. Déda e alguns outros que eu possa ter esquecido de mencionar, por realizarem a manutenção e organização do laboratório.

À minha querida e grande família! À minha mãe, Francilene, por ter me proporcionado a vida! Obrigada por estar comigo e me apoiar em todas as minhas escolhas, por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia e por ser a minha referência como mulher e ser humano. Ao meu pai, Givanildo, por seu amor incondicional. Aos meus irmãos, Renato, Júlia e Sthefany. Em especial, ao Gabriel, por ser um grande exemplo de irmão mais velho, por ser a minha inspiração e me acolher sempre que preciso.

Aos meus avós, Suzete e Domingos, por cuidarem de mim de uma forma tão próxima e amorosa, por sempre estarem dispostos a me acompanhar onde for. À minha avó, Dona Dalva, por me acolher durante semanas em sua casa durante a graduação/pós-graduação e por todo amor demonstrado.

Aos meus tios, Francisco, Franklin e Daiana, por cuidarem de mim em diversas situações e todo amor e carinho. À minha tia Alda, pelo apoio e incentivo durante meu início no meio acadêmico, por ser uma referência em minha vida e por todo amor que existe entre nós.

À minha prima, Emilyn, pelas diversas conversas e trocas extremamente relevantes, pelas fases que compartilhamos juntas, por todo amor e carinho.

À todas as pessoas que de certa forma acompanharam este processo comigo.

Agradeço à Deus, Nossa Senhora Aparecida e esse grande universo, pois sei que forças maiores me auxiliaram durante todos esses anos e me trouxeram até aqui. Que as mesmas forças me guiem por todos os meus caminhos.

"Na diversidade da vida, encontramos a harmonia da natureza e a riqueza de nosso próprio entendimento."

- Thomas Berry

“Juntos, como uma grande família, podemos superar qualquer obstáculo e preservar a biodiversidade.”

(Saldanha, Carlos; A Era do Gelo 2, 2006.)

RESUMO

O gênero *Chironius* é um grupo de serpentes inserido na família Colubridae e subfamília Colubrinae, e é caracterizado por sua ampla distribuição na região Neotropical. *Chironius bicarinatus* e *C. laevicollis* são encontradas na Mata Atlântica, ao passo que *C. flavolineatus* é encontrada principalmente no Cerrado brasileiro. As três espécies são ovíparas, de hábitos diurnos e alimentação baseada em anuros. *Chironius bicarinatus* e *C. flavolineatus* possuem hábito semi-arborícola e *C. laevicollis* hábito terrestre. Para compreender a biologia reprodutiva de uma espécie, diversos parâmetros devem ser analisados, como a morfologia dos tratos reprodutivos de machos e fêmeas, ciclo da gametogênese, vitelogênese, estocagem de espermatozoides, ciclo do segmento sexual renal (SSR), fecundidade, nascimento dos filhotes, maturidade e dimorfismo sexual, além dos comportamentos reprodutivos como corte, cópula, combate e agregação. Os trabalhos encontrados na literatura sobre as espécies em estudo, geralmente descrevem aspectos da história natural por meio de observações em campo e dados morfológicos macroscópicos. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo descrever e comparar aspectos da biologia reprodutiva de machos e fêmeas das espécies *C. bicarinatus*, *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* por meio de análises macro e microscópicas dos aparelhos reprodutores ao longo das estações do ano, bem como a morfologia geral e as táticas reprodutivas adotadas pelas espécies. Os machos das três espécies seguem o padrão reprodutivo contínuo cíclico em nível individual. As fêmeas de *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus* possuem o padrão reprodutivo descontínuo cíclico, ao passo que *C. laevicollis* aparenta adotar o padrão contínuo cíclico. Em nível populacional, as três espécies possuem o padrão reprodutivo sazonal semi-sincrônico para machos e fêmeas. Para os machos das três espécies, bem como para as fêmeas de *C. flavolineatus*, o pico da atividade gonadal (espermio gênese e ovulação) é associado ao período de cópula. Já para as fêmeas de *C. bicarinatus* e *C. laevicollis*, a ovulação ocorre dissociada ao período de acasalamento, ocasionando em uma estocagem de espermatozoides obrigatória nos ovidutos.

Palavras-chave: Ciclos reprodutivos, Dimorfismo sexual, Comportamento reprodutivo, Estocagem de espermatozoides, Segmento sexual renal.

ABSTRACT

The genus *Chironius* is a group of snakes included in the Colubridae family and Colubrinae subfamily and is characterized by its wide distribution in the Neotropical region. *Chironius bicarinatus* and *C. laevis* are found in the Atlantic Forest, while *C. flavolineatus* is found mainly in the Brazilian Cerrado. The three species are oviparous, with diurnal habits and feeding based on anurans. *Chironius bicarinatus* and *C. flavolineatus* have a semi-arboreal habit and *C. laevis* a terrestrial habit. To understand the reproductive biology of a species, several parameters must be analyzed, such as the morphology of the reproductive tracts of males and females, gametogenesis cycle, vitellogenesis, sperm storage, sexual segment of the kidney cycle (SSK), fecundity, birth of offspring, maturity and sexual dimorphism, in addition to reproductive behaviors such as courtship, copulation, combat and aggregation. The works found in the literature on the species under study generally describe aspects of their natural history through field observations and macroscopic morphological data. Therefore, this work aims to describe and compare aspects of the reproductive biology of males and females of the species *C. bicarinatus*, *C. flavolineatus* and *C. laevis* through macroscopic and microscopic analyzes of the reproductive systems throughout the seasons, as well as such as the general morphology and reproductive tactics adopted by the species. Males of the three species follow the continuous cyclical reproductive pattern at the individual level. Females of *C. bicarinatus* and *C. flavolineatus* have a discontinuous cyclical reproductive pattern, while *C. laevis* appears to adopt a continuous cyclical pattern. At a population level, the three species have a semi-synchronous seasonal reproductive pattern for males and females. For males of the three species, as well as for females of *C. flavolineatus*, the peak of gonadal activity (spermiogenesis and ovulation) is associated with the copulation period. For females of *C. bicarinatus* and *C. laevis*, ovulation occurs dissociated from the mating period, resulting in obligatory sperm storage in the oviducts.

Keywords: Reproductive cycles, Sexual dimorphism, Reproductive behavior, Sperm storage, Sexual segment of the kidney.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição geográfica dos exemplares examinados e utilizados no presente estudo.	29
Figura 2 – Climogramas de quatro cidades na Mata Atlântica representando o padrão termopluviométrico para o bioma.....	30
Figura 3 – Climogramas de duas cidades no Cerrado representando o padrão termopluviométrico para o bioma.....	31
Figura 4 – Maturidade sexual em fêmeas e machos de <i>Chironius</i>	32
Figura 5 – Classificação da visualização/formação da UMC macroscopicamente.	34
Figura 6 – Medidas microscópicas coletadas para os machos (hematoxilina-eosina, 40x).	36
Figura 7 – Medidas microscópicas coletadas para as fêmeas (hematoxilina-eosina).....	37
Figura 8 – Classificação da visualização/formação da UMC microscopicamente.....	38
Figura 9 – Distribuição do número de machos e fêmeas de <i>Chironius</i> coletados ao longo do ano.	41
Figura 10 – Número de machos e fêmeas apresentados de acordo com a maturidade sexual.	43
Figura 11 – Dimorfismo sexual no comprimento rostro-cloacal de indivíduos maduros machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	45
Figura 12 – Correlação entre o comprimento caudal e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual no comprimento da cauda (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	46
Figura 13 – Correlação entre o comprimento da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual no comprimento da cabeça (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	47
Figura 14 – Correlação entre a largura da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual na largura da cabeça (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	48
Figura 15 – Correlação entre a altura da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual na altura da cabeça (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	49
Figura 16 – Gráfico de comparação entre os índices de dimorfismo sexual de <i>Chironius</i>	50
Figura 17 – Ciclo espermatogênico de <i>Chironius</i> (hematoxilina-eosina).	52

Figura 18 – Média e variação do diâmetro e da altura do epitélio do túbulo seminífero dos machos de <i>Chironius</i>	54
Figura 19 – Estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes de machos de <i>Chironius</i> (hematoxilina-eosina).	55
Figura 20 – Média e variação do diâmetro e da altura do epitélio do ducto deferente dos machos de <i>Chironius</i>	57
Figura 21 – Ciclo do segmento sexual renal de <i>Chironius</i> (hematoxilina-eosina).	58
Figura 22 – Média e variação do diâmetro e da altura do epitélio do SSR dos machos de <i>Chironius</i>	60
Figura 23 – Resumo dos eventos do ciclo reprodutivo dos machos de <i>Chironius</i>	62
Figura 24 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>C. bicarinatus</i>	63
Figura 25 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>C. flavolineatus</i>	64
Figura 26 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>C. laevicollis</i>	65
Figura 27 – Correlação entre o comprimento rostro-cloacal das fêmeas reprodutivas e o tamanho da ninhada em <i>Chironius</i>	68
Figura 28 – Infundíbulo posterior das fêmeas de <i>Chironius</i> (hematoxilina-eosina).	70
Figura 29 – Variação da altura do epitélio infundibular (μm) considerando as estações do ano e o estágio reprodutivo das fêmeas.	71
Figura 30 – Útero glandular das fêmeas de <i>Chironius</i> (hematoxilina-eosina).	74
Figura 31 – Variação da altura do epitélio uterino (μm) considerando as estações do ano e o estágio reprodutivo das fêmeas.	75
Figura 32 – Variação do diâmetro das glândulas uterinas (μm) considerando as estações do ano e o estágio reprodutivo das fêmeas.	76
Figura 33 – Variação na altura da camada da granulosa (μm) de acordo com o estágio reprodutivo das fêmeas.	77
Figura 34 – UMC observada em fêmeas de <i>C. bicarinatus</i>	78
Figura 35 – Espermatozoides ao longo do oviduto de fêmeas de <i>C. bicarinatus</i> (hematoxilina-eosina).	80
Figura 36 – Espermatozoides ao longo do oviduto de fêmeas de <i>C. flavolineatus</i> (hematoxilina-eosina).	82
Figura 37 – Espermatozoides ao longo do oviduto de fêmeas de <i>C. laevicollis</i> (hematoxilina-eosina).	83
Figura 38 – Resumo dos eventos do ciclo reprodutivo das fêmeas de <i>Chironius</i>	85
Figura 39 – Resumo dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	86

Figura 40 – Combate entre machos de <i>C. bicarinatus</i> em Guarapari, Espírito Santo (outono) registrado e disponibilizado por Cacá Lima.	88
Figura 41 – Comportamento reprodutivo das espécies estudadas.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número total de exemplares analisados divididos por espécie.	29
Tabela 2 – Classificação dos túbulos seminíferos nos estágios da espermatogênese.	36
Tabela 3 – Classificação dos estágios da hipertrofia do segmento sexual renal.	37
Tabela 4 – Médias $\pm$ desvio padrão, valores mínimo e máximo e <i>n</i> amostral das medidas morfológicas dos indivíduos maduros machos e fêmeas de <i>Chironius</i>	44
Tabela 5 – Médias $\pm$ desvio padrão, valores mínimo e máximo e <i>n</i> amostral das medidas morfológicas macroscópicas do trato reprodutivo dos machos de <i>Chironius</i>	51
Tabela 6 – Número de exemplares distribuídos de acordo com cada estágio da espermatogênese nas estações do ano.	52
Tabela 7 – Número de exemplares distribuídos de acordo com cada estágio da hipertrofia do segmento sexual renal (SSR).	58
Tabela 8 – Frequência reprodutiva nas espécies de <i>Chironius</i> estudadas.	66
Tabela 9 – Médias $\pm$ erro padrão, valores mínimo e máximo e <i>n</i> amostral da altura do epitélio do infundíbulo posterior das fêmeas de <i>Chionius</i>	70
Tabela 10 – Médias $\pm$ erro padrão, valores mínimo e máximo e <i>n</i> amostral das medidas microscópicas do útero glandular das fêmeas de <i>Chironius</i>	73
Tabela 11 – Estocagem de espermatozoides e presença da UMC nas fêmeas de <i>C. bicarinatus</i>	79
Tabela 12 – Estocagem de espermatozoides nas fêmeas de <i>C. flavolineatus</i>	81
Tabela 13 – Estocagem de espermatozoides nas fêmeas de <i>C. laevicollis</i>	83
Tabela 14 – Eventos reprodutivos observados nas espécies estudadas.	87

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AEU	Altura do epitélio uterino
Altcab	Altura da cabeça
ANCOVA	Análise de covariância
ANOVA	Análise de variância
CC	Comprimento da cauda
Ccab	Comprimento da cabeça
Cm	Camada muscular
CRC	Comprimento rostro-cloacal
CT	Comprimento testicular
Dd	Ducto deferente direito
DDD	Diâmetro do ducto deferente
DGU	Diâmetro das glândulas uterinas
e.g.	Por exemplo
Ep	Epitélio germinativo
EpI	Epitélio infundibular
EpU	Epitélio uterino
EpV	Epitélio vaginal
ER	Estágio reprodutivo
et al	E outros
Gr	Camada da granulosa
Gs	Grânulos secretores
Gu	Glândulas uterinas
HE	Hematoxilina-Eosina
i.e	Isto é
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
in prep	Em preparação
JA	Julho/agosto
JF	Janeiro/fevereiro
JUV	Junção útero-vaginal
L	Lúmen
Log	Logaritmo

Lcab	Largura da cabeça
MA	Março/abril
Mc	Camada muscular circular interna
MJ	Maió/junho
MI	Camada muscular circular longitudinal
mm	Milímetros
<i>n</i>	Número amostral
ND	Novembro/dezembro
OVe	Ovário esquerdo
<i>p</i>	<i>p</i> -valor
Rd	Rim direito
Rs	Receptáculos de espermatozoides
SO	Setembro/outubro
Spz IP	Espermatozoides estocados no infundíbulo posterior
Spz JUV	Espermatozoides estocados na junção útero-vaginal
Spz UG	Espermatozoides no útero glandular
Spz Vag	Espermatozoides na vagina
Sr	Serosa
SSD	Índice de dimorfismo sexual de tamanho
SSR	Segmento sexual renal
UGd	Útero glandular direito
UGe	Útero glandular esquerdo
UMC	Uterine muscular coiling
UMT	Uterine muscular twisting
V1	Folículos primários / pré-vitelogênicos
V2	Folículos secundários / vitelogênicos
Vag	Vagina
vs.	Versus
VT	Volume Testicular

LISTA DE SÍMBOLOS

π	Valor de pi
μm	Micrômetro
$<$	Menor
$\leq$	Menor ou igual
$>$	Maior
$\geq$	Maior ou igual
$+$	Mais / positivo / presença
$-$	Menos / negativo / ausência
$=$	Igual
$\pm$	Mais ou menos
$\bar{x}$	Média amostral
$\%$	Porcentagem
♀	Fêmea
♂	Macho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Modelos de estudo	20
1.2 Biologia reprodutiva	21
2 OBJETIVO	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MÉTODOS	29
3.1 Espécimes amostrados e padrão de atividade	29
3.2 Área de estudo	30
3.2.1 Mata Atlântica	30
3.2.2 Cerrado	31
3.3 Maturidade e dimorfismo sexual	31
3.4 Caracterização do ciclo reprodutivo	33
3.4.1 Análise macroscópica: Morfometria linear	33
3.4.2 Análise microscópica: Histologia	34
3.5 Comportamentos reprodutivos	38
3.6 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS	40
4.1 Espécimes amostrados e padrão de atividade	40
4.2 Maturidade e dimorfismo sexual	42
4.2.1 Maturidade sexual	42
4.2.2 Dimorfismo sexual	43
4.2.3 Resumo do dimorfismo sexual de tamanho (SSD) nas três espécies	49
4.3 Caracterização dos ciclos reprodutivos dos machos	50
4.3.1 Variação do comprimento, volume testicular e diâmetro do ducto deferente	50
4.3.2 Ciclo espermatogênico	52
4.3.3 Estocagem e sazonalidade do ducto deferente	55
4.3.4 Sazonalidade do segmento sexual renal (SSR)	58
4.3.5 Resumo dos ciclos reprodutivos dos machos	61
4.4 Caracterização dos ciclos reprodutivos das fêmeas	62
4.4.1 Sazonalidade da vitelogênese, prenhez e nascimento de filhotes	62

4.4.2	Frequência reprodutiva e tamanho da ninhada	66
4.4.3	Variação sazonal do infundíbulo posterior	69
4.4.4	Variação sazonal do útero glandular	72
4.4.5	Variação na camada da granulosa	77
4.4.6	Estocagem de espermatozoides e UMC	78
4.4.7	Resumo dos ciclos reprodutivos das fêmeas	84
4.5	Resumo dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas das espécies de <i>Chironius</i>	86
4.6	Comportamentos reprodutivos	87
5	DISCUSSÃO	89
5.1	Padrão de atividade	89
5.2	Maturidade e dimorfismo sexual	90
5.3	Fecundidade	94
5.4	Ciclos reprodutivos	96
6	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE A – Identificação dos exemplares analisados.	121
	APÊNDICE B – Fêmeas ovígeras de <i>C. bicarinatus</i>.	124



Chironius bicarinatus, *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* em vida, respectivamente. Fotos como cortesia de: João R. Martins (esquerda); Daniel Passos (direita); e Jairo Vinicius (centro).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Modelos de estudo

A ordem Squamata é uma linhagem evolutiva na qual as serpentes, lagartos e anfisbenas estão alocados. Atualmente, Squamata é o grupo com a maior diversidade de répteis existentes, incluindo mais de 11 mil espécies reconhecidas (UETZ et al., 2023). Para o grupo das serpentes, são registradas mais de 4 mil espécies, divididas em aproximadamente 30 famílias (UETZ et al., 2023). No Brasil, atualmente são reconhecidas 10 famílias e 430 espécies de serpentes (COSTA et al., 2023).

O gênero *Chironius* (Fitzinger, 1826) está inserido na família Colubridae, subfamília Colubrinae, tribo Colubrini (FERRAREZZI, 1994), alocando atualmente 23 espécies descritas (DIXON et al., 1993; HOLLIS, 2006; KOK, 2010; PYRON et al., 2013; FERNANDES; HAMDAN, 2014, 2015; NOGUEIRA et al., 2019; UETZ et al., 2023). O grupo possui uma larga distribuição geográfica na região Neotropical, abrangendo desde a Nicarágua até todo o território da América do Sul, exceto a Patagônia (NOGUEIRA et al., 2019).

As serpentes deste gênero habitam, de modo geral, florestas pluviais tropicais e florestas úmidas de altitude, além de áreas abertas do Cerrado, sendo encontradas até 2800 metros de altitude do nível do mar (DIXON et al., 1993; NOGUEIRA et al., 2019). São serpentes ovíparas, apresentam dentição áglifa, hábitos diurnos e embora a alimentação seja baseada principalmente em anuros, a composição desta dieta pode variar de acordo com o substrato utilizado por cada espécie, como por exemplo hilídeos (arbóreos) e leptodactilídeos (terrestres) (DIXON et al., 1993; MARQUES; SAZIMA, 2004; ROBERTO; SOUZA, 2020; BANCİ et al., 2022).

Chironius bicarinatus (Wied-Neuwied, 1820) é encontrada na Argentina, no Paraguai, no Uruguai e no Brasil, sendo no último, amplamente distribuída na região da Mata Atlântica desde baixas à grandes altitudes (NOGUEIRA et al., 2019). Apresenta hábito semi-arborícola e dieta baseada em anuros arborícolas e terrestres, como hilídeos e leptodactilídeos, além de lagartos como *Hemidactylus mabouia* (DIXON et al., 1993; MARQUES; SAZIMA, 2004; OLIVEIRA, 2008; VRCIBRADIC; EISFELD, 2016; BANCİ et al., 2022). Possui grande porte, cabeça de tamanho médio, cauda longa e atinge até 1800 mm de comprimento total (DIXON et al., 1993; BANCİ et al., 2022).

Chironius flavolineatus (Jan, 1863) ocorre na Bolívia, no Paraguai e no Brasil, sendo no último, registrada principalmente no Cerrado, desde grandes altitudes a altitudes intermediárias, ocorrendo ainda em enclaves de savana da Amazônia, Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica

(NOGUEIRA et al., 2019). Apresenta hábito semi-arborícola e alimentação baseada em anuros da família Hilydae e Leptodactylidae, além do lagarto *Hemidactylus mabouia* (DIXON et al., 1993; PINTO et al., 2008; VRCIBRADIC; EISFELD, 2016). Possui médio porte e corpo mais delgado, cabeça pequena, cauda de tamanho médio e atinge cerca de 1300 mm de comprimento total (DIXON et al., 1993; PINTO et al., 2008).

Chironius laevicollis (Wied-Neuwied, 1824) é endêmica do Brasil, com ocorrência na costa leste da América do Sul, no domínio da Mata Atlântica, principalmente em baixas elevações (NOGUEIRA et al., 2019). Possui hábito terrestre e composição alimentar baseada em anuros terrestres da família Leptodactylidae (DIXON et al., 1993; MARQUES, 1998; BANCI et al., 2022). Apresenta o corpo mais robusto, cabeça grande, cauda curta e atinge cerca de 2400 mm de comprimento total (DIXON et al., 1993; BANCI et al., 2022).

1.2 Biologia reprodutiva

Estudar a biologia reprodutiva das serpentes nos permite compreender aspectos importantes, tais como o ciclo da gametogênese (oogênese e espermatogênese), a estocagem de espermatozoides, o ciclo do segmento sexual renal, a fecundidade (tamanho, massa relativa da ninhada e frequência reprodutiva), o período de prenhez/gestação, oviposição/parturição, o nascimento de filhotes, a maturidade e dimorfismo sexual, além dos sistemas de acasalamento e comportamentos reprodutivos como corte, cópula e cuidado parental (GOLDBERG; PARKER, 1975; KROHMER, 2004; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2020).

No que diz respeito a morfologia do trato reprodutivo feminino das serpentes, sua composição é feita por dois ovários alongados (direito e esquerdo) que se localizam no plano dorso medial da cavidade celomática do animal e, paralelo a eles, os ovidutos, constituídos pelo infundíbulo anterior e posterior, útero, junção útero-vaginal e vagina (SIEGEL et al., 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Algumas espécies de serpentes (e.g. *Tantilla coronata* e *Amerotyphlops brongersmianus*) podem apresentar o oviduto esquerdo reduzido ou até mesmo ausente (ALDRIDGE, 1992; BLACKBURN, 1998; KHOURI, 2020). Os órgãos reprodutivos apresentam assimetria bem definida, sendo o ovário e o oviduto localizados no antímero direito mais cranial em relação ao antímero esquerdo (SIEGEL et al., 2011). Nas fêmeas, a estocagem de espermatozoides ocorre em duas regiões do oviduto: no infundíbulo posterior, que apresenta túbulos especializados formados por invaginações do epitélio luminal e são denominados receptáculos de esperma ou seminais; e na junção útero-vaginal, que apresenta sulcos profundos formados por projeções longitudinais da lâmina própria (SIEGEL et al., 2011; ROJAS et al., 2015). Em algumas serpentes, tais como os viperídeos, ocorre um fenômeno na porção da

junção útero-vaginal denominado *uterine muscular coiling*, a UMC (MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2020), onde os sulcos formados podem reter espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; BARROS et al., 2012). A formação da UMC ocorre a partir da contração da camada muscular circular interna presente no oviduto e juntamente com a mucosa, se dispõem em uma helicoidal (MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018).

O período reprodutivo das fêmeas de serpentes é caracterizado pelo crescimento folicular (vitelogênese). Os folículos ovarianos pré-vitelogênicos são pequenos e esbranquiçados e à medida em que ocorre a deposição de vitelo, se tornam folículos vitelogênicos, que apresentam maiores diâmetros e coloração amarelada (PIZZATTO et al., 2007). O processo da vitelogênese tem início quando os lipídios estocados em forma de gordura abdominal são metabolizados no fígado. A transformação de gordura abdominal em vitelo é mediada pela vitelogenina e a deposição de vitelo nos folículos ocorre via corrente sanguínea (SHERIDAN, 1994; SILVA et al., 2013; SUEIRO, 2013). Ainda durante esse processo, partículas de vitelogenina presentes na corrente sanguínea são liberadas para o meio externo por meio das escamas, atuando como um feromônio que é facilmente detectado pelos machos (GILLINGHAM, 1987; DEL-CLARO et al., 2004; SUEIRO, 2013).

O aparelho reprodutor masculino de serpentes é constituído por dois testículos, ductos deferentes (onde ocorre a estocagem de espermatozoides) e um par de hemipênis (VOLSOE, 1944; FOX, 1977; ROJAS et al., 2013). O sistema reprodutor está localizado no plano dorso-medial da cavidade celomática e o testículo localizado no antímero direito é mais cranial que o esquerdo (GRIBBINS; RHEUBERT, 2011). Além dessas estruturas, os machos de serpentes possuem os rins como órgãos acessórios devido ao segmento sexual renal (SSR), originado a partir da hipertrofia de porções do néfron que pode variar entre as espécies (túbulos contorcidos proximais e distais, ductos coletores e ureter) (SAINT GIRON, 1972). A atividade do SSR é andrógeno-dependente e a hipertrofia é observada quando existe um aumento na concentração de testosterona na corrente sanguínea, geralmente associada à época de acasalamento, quando os testículos estão produzindo grandes quantidades de espermatozoides (VOLSOE, 1944; BISHOP, 1959; FOX, 1977; SCHUETT et al., 2002).

Os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de serpentes apresentam algumas variações e são caracterizadas em nível individual, seguindo três padrões: ciclo descontínuo, ciclo contínuo e acíclico (MATHIES, 2011). O ciclo descontínuo é caracterizado pela total quiescência das gônadas (i.e. pausa na produção de gametas) e órgãos acessórios (i.e. pausa na atividade secretora dos ductos deferentes, SSR, infundíbulo posterior e útero glandular) durante um período do ano. No ciclo contínuo ocorre apenas uma diminuição na atividade das gônadas e

órgãos acessórios durante um período do ano. No padrão acíclico as gônadas e órgãos acessórios apresentam constante atividade durante todo o período do ano (MATHIES, 2011).

As variações dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas em nível individual são, de modo geral, determinantes para avaliar o tipo de ciclicidade reprodutiva que se expressa em nível populacional, que pode ser dividida em três categorias: sazonal sincrônico, semi-sincrônico e assazonal assincrônico (MATHIES, 2011). No ciclo sazonal sincrônico o período reprodutivo ocorre simultaneamente em machos e fêmeas. No ciclo sazonal semi-sincrônico o período reprodutivo ocorre sem uma sincronia marcadamente fechada em machos e fêmeas. No ciclo assazonal assincrônico o período reprodutivo não apresenta nenhum nível de sincronia em machos e fêmeas (MATHIES, 2011).

Existe uma outra classificação dos ciclos reprodutivos, a qual relaciona o pico de atividade gonadal (ovulação e espermição) com o período de cópula (CREWS, 1984). Em serpentes cujo pico de atividade testicular e a ovulação ocorrem sincrônicos ao período de cópula, o ciclo é classificado como pré-nupcial (ou associado). Em contrapartida, serpentes que não apresentam uma sincronia entre o período de cópula e a ovulação e espermição possuem um ciclo classificado como pós-nupcial (ou dissociado), resultando em uma estocagem de espermatozoides obrigatória nas fêmeas (SAINT GIRONS, 1982; CREWS, 1984).

O dimorfismo sexual (e.g., tamanho da cabeça, do corpo e cauda) tem sido observado em vários táxons de serpentes (e.g. Boidae, Colubridae, Dipsadidae, Elapidae, Viperidae) e a análise desta característica reprodutiva pode fornecer pistas acerca do comportamento reprodutivo da espécie (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014) e ser determinante para o tipo de sistema de acasalamento que a espécie exibe (PIZZATTO et al., 2007). De acordo com Shine (1978, 1994), espécies onde os machos atingem tamanhos corporais maiores do que as fêmeas, é esperado que ocorra o ritual de combate. Lovich e Gibbons (1992) realizaram uma revisão literária sobre fórmulas propostas para calcular o índice de dimorfismo sexual. E a partir disso, Shine (1994) formulou um índice de dimorfismo sexual de tamanho (Sexual Size Dimorphism - SSD) para analisar e comparar o tamanho do corpo entre machos e fêmeas com base em diferentes tipos de dados: (1) utilizando a média do comprimento rostro-cloacal (CRC) de machos e fêmeas, (2) considerando o tamanho corporal (CRC) máximo atingido por cada um dos sexos, (3) comparando o CRC com que machos e fêmeas atingem a maturidade sexual.

Os sistemas de acasalamento são definidos de acordo com o número de parceiros que um sexo pode acumular durante o período reprodutivo e são caracterizados com base no potencial ecológico e comportamental de monopolizar os parceiros e pelos meios com os quais essa monopolização ocorre (EMLEN; ORING, 1977). A monogamia é um tipo de sistema de

acasalamento no qual existe a união entre uma fêmea e um macho por período reprodutivo e nenhum dos sexos tem a oportunidade de monopolizar membros adicionais do sexo oposto; e a aptidão a este sistema é maximizada por meio do cuidado parental compartilhado (EMLEN; ORING, 1977). O sistema de acasalamento monogâmico tem sido observado em algumas espécies de lagartos (e.g. *Tiliqua rugosa* e *Anolis limifrons*), mas é inexistente em serpentes (BULL et al., 1998; HARRISON, 2013). A poligamia é um outro tipo de sistema de acasalamento no qual ocorre a formação de mais de um casal por período reprodutivo e quanto maior o potencial de monopolização de recursos ou parceiros, maior será a intensidade da seleção sexual e o potencial para a poligamia (EMLEN; ORING, 1977). O sistema de acasalamento poligâmico pode ser dividido em poliginia (um macho para mais de uma fêmea), poliandria (uma fêmea para mais de um macho) e poliginandria/promiscuidade (ambos os sexos copulam com mais de um parceiro) e a definição de cada um desses sistemas poligâmicos irá depender do referencial que está sendo levado em consideração (i.e. se são os machos ou as fêmeas) (EMLEN; ORING, 1977; RIVAS; BURGHARDT, 2005; KARL, 2008; RUBENSTEIN; ALCOCK, 2019).

Alguns trabalhos que abordam os sistemas de acasalamento das serpentes as consideram poligínicas (e.g. DUVALL et al., 1992, 1993; DUVALL; SCHUETT, 1997; SHINE; FITZGERALD, 1995). Isso ocorre devido ao fato de analisarem o sistema de acasalamento apenas pela perspectiva do macho. No entanto, Rivas e Burghardt (2005) trazem a contraproposta de que o sistema de acasalamento das serpentes, na verdade, é a poliginandria, pois as fêmeas também podem acasalar com mais de um macho por estação reprodutiva, inclusive, sendo constatada múltipla paternidade em algumas espécies (e.g. *Nerodia sipedon* PROSSER et al., 2002; *Pantherophis obsoletus* BLOUIN-DEMERS et al., 2005).

Aspectos comportamentais também estão envolvidos no estudo da biologia reprodutiva de serpentes, como por exemplo: corte, cópula, combate entre machos, agregações reprodutivas e cuidado parental (SHINE, 2003; SHINE; BONNET, 2009). Comportamento reprodutivo é qualquer comportamento que se torne uma vantagem adaptativa desde que resulte em mais oportunidades de acasalamento e, conseqüentemente, um maior número de filhotes (KREBS; DAVIES, 1997).

Antes de discorrer sobre os comportamentos reprodutivos das serpentes, é importante compreender como elas se comunicam. Os meios de comunicação em serpentes se dão, principalmente, pelos sinais químicos (órgão vomeronasal) e táteis (CARPENTER, 1977; SHINE; MASON, 2012). As serpentes possuem um sistema vomeronasal bem desenvolvido e de extrema importância na comunicação interespecífica (i.e. presas) e intraespecífica (i.e.

fêmeas, machos, filhotes) (MASON; PARKER, 2010; SHINE; MASON, 2012). As pistas químicas deixadas no ar ou substrato são captadas pela língua bifurcada e identificadas pelo órgão vomeronasal, localizado no palato ou passagens nasais, permitindo ao macho, por exemplo, distinguir fêmeas maiores das menores e fêmeas que copularam recentemente das que não copularam, como observado em *Thamnophis sirtalis* (GARSTKA; CREWS, 1981; LEMASTER; MASON, 2002; O'DONNELL et al., 2004; MASON; PARKER, 2010). A comunicação tátil se dá por meio do contato físico com outro (s) indivíduo (s) na tentativa de estimular a corte, cópula e agregação reprodutiva, ou na definição de dominância (combate entre machos) (CARPENTER, 1977).

O combate entre machos de serpentes é uma interação agonística observada em vários táxons, como por exemplo: Boidae (e.g. PIZZATTO et al., 2006), Colubridae (e.g. ARAÚJO et al., 2022a), Elapidae (e.g. MISSASSI et al., 2022) e Viperidae (e.g. FONSECA et al., 2022) (SENDER, 2022). Este comportamento é um exemplo de seleção intra-sexual, onde os machos competem pelo acesso a fêmea, territorialidade ou dominância (ALMEIDA-SANTOS et al., 1999; GUEDES et al., 2019; BATISTA et al., 2021). As principais características do combate incluem o contato corporal entre os machos, onde os oponentes exercem pressão por meio de empurrões ou entrelaçamentos, com o objetivo de subjugar fisicamente o rival (CARPENTER, 1977). Algumas espécies de serpentes combatem de forma ritualizada, realizando sempre os mesmos movimentos durante a disputa (ALMEIDA-SANTOS et al., 2002; MUNIZ-DASILVA et al., 2014). Entretanto, existem relatos de espécies (e.g. *Corallus hortulanus*, *Oxybelis aeneus*, *Xenopeltis unicolor*) que disputam de forma mais agressiva, realizando mordidas na cabeça e corpo do rival (CAPULA; LUISELLI, 1997; GOODYEAR; GILBERT, 2018; SANTOS et al., 2020; ARAÚJO et al., 2022a).

Os comportamentos de corte observados em serpentes são realizados pelos machos, e caracterizam-se por: seguir a fêmea, montagem dorsal e alinhamento paralelo, fricção da região gular no dorso da fêmea, movimentos ondulatórios da cauda à cabeça (i.e. ondas caudocefálicas), busca pela cauda e mordidas (CARPENTER, 1977). Uma vez estabelecido o pareamento, as caudas se entrelaçam e a fêmea deve expor a cloaca para que ocorra a intromissão do hemipênis (CARPENTER, 1977).

A corte e cópula podem se tornar um evento complexo, ocorrendo com mais de dois indivíduos da mesma espécie. As denominadas *mating balls* se tratam de agregações entre uma fêmea e mais de um macho durante a estação reprodutiva, geralmente isenta de interações agonísticas e/ou agressividade entre os machos, onde a fêmea tem a possibilidade de copular com mais de um macho (CREWS; GARSTKA, 1982; FEIO et al., 1999; RIVAS;

BURGHARDT, 2001; COUTO et al., 2022). Esse comportamento reprodutivo já foi descrito para os boídeos (e.g. *Eunectes murinus* e *Boa constrictor*, RIVAS; BURGHARDT, 2001; ALMEIDA-SANTOS; SAWAYA, 2022) e colubrídeos (e.g. *Thamnophis sirtalis* e *Philodryas olfersii*, CREWS; GARSTKA, 1982; BANCI et al., 2021).

Marques (1998) analisou cinco espécies de serpentes do gênero *Chironius* que habitam a Mata Atlântica, incluindo *C. bicarinatus* e *C. laevicollis*. Segundo o estudo, ambas apresentam reprodução sazonal restrita à estação chuvosa, o que pode ser vantajoso em relação às temperaturas mais adequadas para o desenvolvimento embrionário e disponibilidade de alimento.

O estudo da biologia reprodutiva por meio de observações em campo e dados morfológicos macroscópicos do trato reprodutivo de *C. bicarinatus* indica que sejam animais sazonais com o padrão reprodutivo dissociado (MARQUES, 1998; MARQUES; SAZIMA, 2004; MARQUES et al., 2009). A cópula foi observada em quatro eventos, sempre no mês de abril, com duração de até 180 minutos. A vitelogênese inicia no outono e a ovulação deve acontecer no início da primavera, onde fêmeas são encontradas ovígeras. A ovipostura foi observada em outubro e novembro e o nascimento dos filhotes em fevereiro (MARQUES, 1998; MARQUES; SAZIMA, 2004; MARQUES, et al., 2009). A espécie apresenta dimorfismo sexual, onde os machos são maiores que as fêmeas no comprimento rostro-cloacal (CRC) e possuem uma cauda mais longa (RODRIGUES, 2007). O combate entre machos de *C. bicarinatus* foi observado em novembro (primavera) com uma disputa bem ritualizada (ALMEIDA-SANTOS et al., 2002). O ritual de combate entre machos está associado a vitelogênese das fêmeas, mas não necessariamente com o período da cópula (ALMEIDA-SANTOS et al., 2002; MARQUES et al., 2009).

Para *C. laevicollis* é descrito que as fêmeas se reproduzem sazonalmente, com a vitelogênese ocorrendo de agosto a dezembro e fêmeas ovígeras encontradas em outubro e novembro (primavera) (MARQUES, 1998). A ovipostura foi observada em setembro, novembro e janeiro e o nascimento dos filhotes de janeiro a maio (RIBEIRO DA COSTA et al., 2005). O dimorfismo sexual no tamanho do corpo e da cauda é ausente (RODRIGUES, 2007). A corte e cópula de *C. laevicollis* foi observada em setembro (primavera), com uma provável disputa entre machos e como resultado disso, a fêmea apresenta um mecanismo de escolha de parceiros que mimetiza o comportamento sexual intraespecífico de combate por meio de levantamento da cabeça (i.e. *head lifting*) (ARAÚJO et al., 2022b). Disputas entre machos de *C. laevicollis* foram observadas durante a primavera (ALMEIDA-SANTOS et al.,

in prep) e ocorrem em sincronia com a vitelogênese e o período de acasalamento (MARQUES, 1998; ARAÚJO et al., 2022b).

Pinto et al. (2010) descreveram que as fêmeas de *C. flavolineatus* possuem um ciclo reprodutivo sazonal, com fêmeas vitelogênicas e ovígeras ocorrendo principalmente durante a primavera e verão e a postura de ovos concentrada nos meses mais quentes e úmidos (verão). Para os machos, os autores descreveram uma produção contínua de espermatozoides nos testículos e uma estocagem constante nos ductos deferentes. *Chironius flavolineatus* apresenta dimorfismo sexual, onde as fêmeas são significativamente maiores que os machos no comprimento rostro-cloacal (CRC); por outro lado, os machos apresentam uma cauda mais longa (PINTO et al., 2008). No que diz respeito ao comportamento reprodutivo, uma corte de *C. flavolineatus* envolvendo uma fêmea e seis machos foi observada em outubro (primavera) e houve uma certa disputa entre os machos para permanecer em contato com a fêmea, mas nenhum comportamento agressivo ou combate foi observado (FEIO et al., 1999). Devido ao estresse da fêmea, os autores interromperam o evento, onde as últimas fases de corte (alinhamento tátil, intromissão e cópula) não foram observadas.

Contudo, os trabalhos que abordam aspectos da biologia reprodutiva das espécies de *Chironius*, baseiam-se principalmente em observações de campo ou cativeiro e, quando se trata do delineamento do ciclo reprodutivo, utilizam como base apenas características macroscópicas do trato reprodutivo, tais como o tamanho e/ou volume dos testículos, ductos deferentes e folículos ovarianos, bem como a presença de ovos nos ovidutos, sendo este método não fidedigno para determinar o ciclo reprodutivo de uma espécie (MATHIES, 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Portanto, estudos que englobam análises microscópicas do aparelho reprodutor de machos e fêmeas se fazem extremamente necessários para delinear o ciclo reprodutivo de uma espécie e então associar aos demais eventos reprodutivos passíveis de serem observados em campo (MATHIES, 2011).

Além disso, por se tratar de um grupo diverso e amplamente distribuído na região Neotropical, definir espécies de *Chironius* como “modelos” por meio da compreensão dos ciclos reprodutivos, bem como de outras estratégias reprodutivas adotadas, pode nortear e encorajar pesquisas futuras com os outros congêneres, buscando avaliar a existência de padrões conservados no gênero, assim como é observado em viperídeos, por exemplo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Descrever e comparar aspectos da biologia reprodutiva de machos e fêmeas de *Chironius bicarinatus*, *C. laevicollis* e *C. flavolineatus*.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o padrão de atividade de machos e fêmeas de cada espécie e associar aos eventos reprodutivos;
- Investigar a presença de dimorfismo sexual de tamanho e comparar entre as espécies;
- Avaliar o tamanho em que machos e fêmeas atingem a maturidade sexual em cada espécie;
- Avaliar se existe relação entre o tamanho da ninhada e o tamanho materno;
- Descrever o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas e comparar entre as espécies;
- Estimar o período de acasalamento em cada espécie;
- Associar os comportamentos reprodutivos ao ciclo reprodutivo de machos e fêmeas e dimorfismo sexual de cada espécie.

3 MÉTODOS

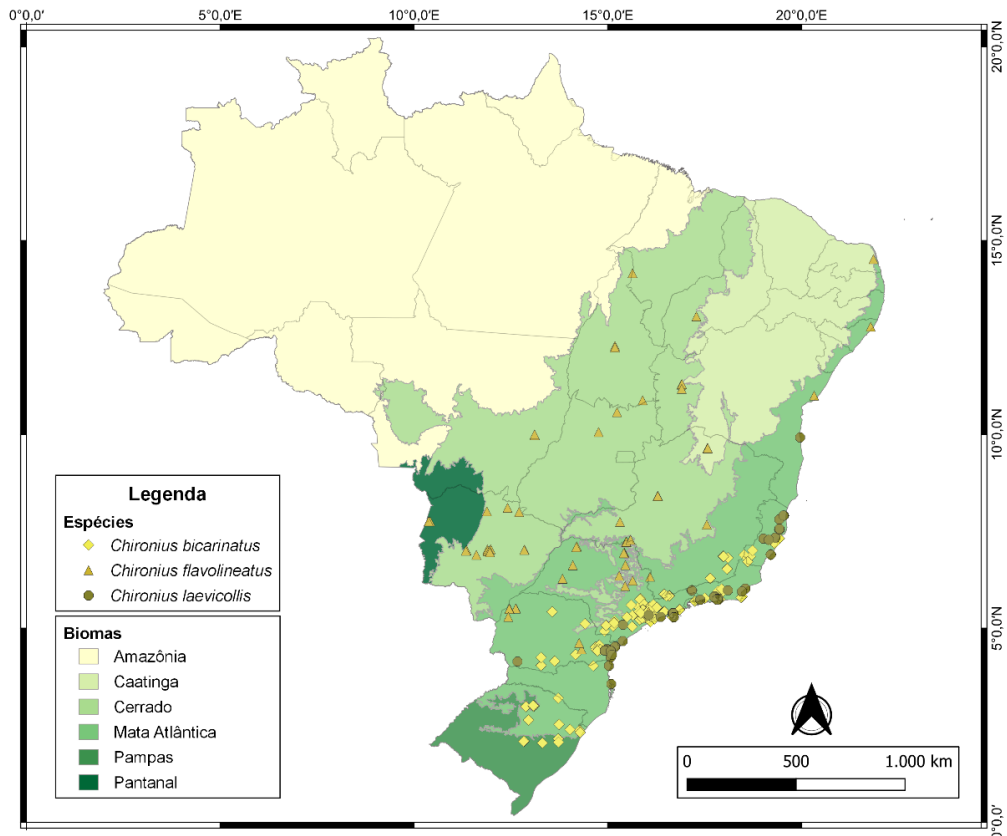
3.1 Espécimes amostrados e padrão de atividade

Foram analisados espécimes de *Chironius bicarinatus*, *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* (machos, fêmeas e imaturos), oriundos de coleções herpetológicas e museus zoológicos (Apêndice A) totalizando 359 exemplares examinados (Tabela 1), provenientes principalmente da Mata Atlântica e Cerrado, além de poucas amostras no Pantanal e áreas ecotonais como os Pampas e Caatinga (Figura 1). Para todos os espécimes foram coletadas informações de procedência e data de coleta e/ou óbito para inferir o padrão de atividade das espécies.

Tabela 1 – Número total de exemplares analisados divididos por espécie.

	Machos	Fêmeas	Imaturos	Filhotes	Total
<i>C. bicarinatus</i>	85	83	17	27	212
<i>C. flavolineatus</i>	26	28	8	16	78
<i>C. laevicollis</i>	27	22	7	13	69
Total	138	133	32	56	359

Figura 1 – Distribuição geográfica dos exemplares examinados e utilizados no presente estudo.



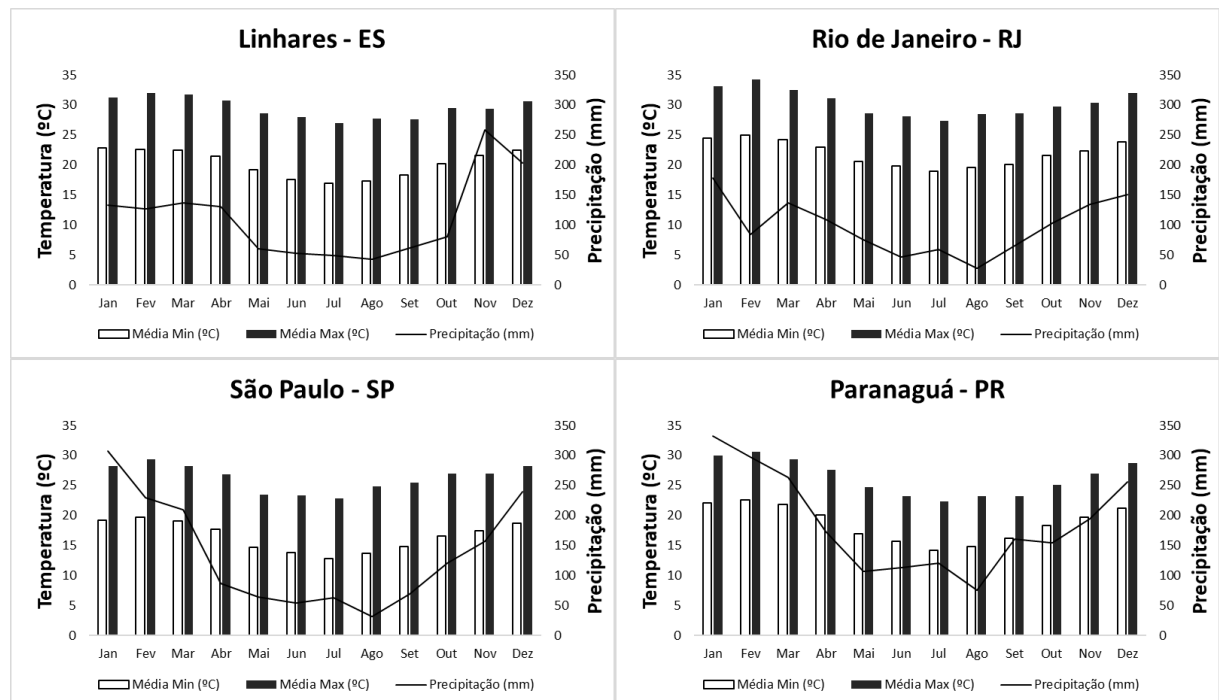
Fonte: Araújo, G. S. 2023

3.2 Área de estudo

3.2.1 Mata Atlântica

Nas áreas de Mata Atlântica onde as espécies *Chironius bicarinatus* e *C. laevicollis* ocorrem, os climas predominantes são tropical úmido-seco e subtropical úmido (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). Essas regiões são influenciadas pelas massas de ar oriundas do oceano atlântico. O clima tropical úmido-seco (sem seca) apresenta temperaturas elevadas durante o verão, e reduzidas no inverno. O período chuvoso é concentrado durante o verão e o inverno, embora ocorra ao longo de todos os meses do ano (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). No clima subtropical úmido, a temperatura apresenta uma certa sazonalidade, de quente a fresco durante o verão, e de fresco a frio durante o inverno; a pluviosidade é bem distribuída durante todo o ano nas localidades com este tipo de clima (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). Os climogramas para as principais regiões amostradas nesse bioma foram elaborados a partir de dados do INMET, entre os anos de 2010 e 2022 (Figura 2).

Figura 2 – Climogramas de quatro cidades na Mata Atlântica representando o padrão termopluiométrico para o bioma. Média anual da temperatura mínima, máxima e precipitação.

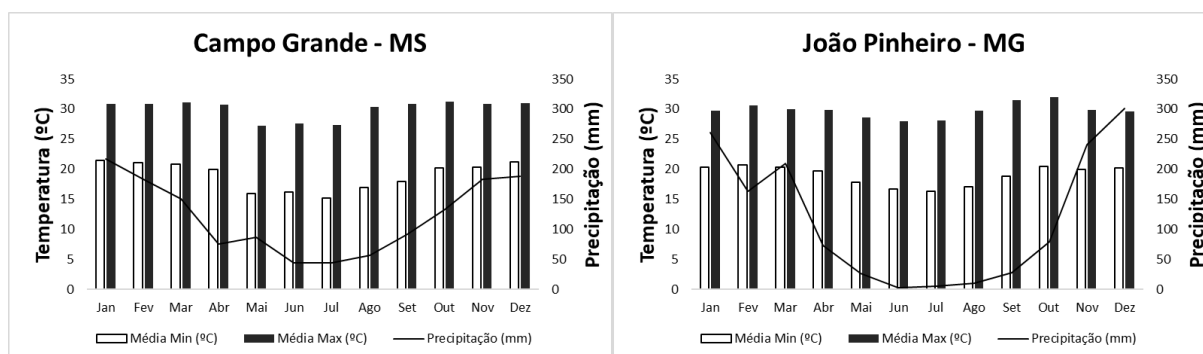


Fonte: Araújo, G. S. 2023

3.2.2 Cerrado

Nas áreas do Cerrado brasileiro onde a espécie *C. flavolineatus* ocorre, o clima é predominantemente tropical úmido-seco (com 1 a 8 meses seco; MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). As localidades nesta região são influenciadas por massas de ar provenientes do continente (Floresta Amazônica) e oceano Atlântico. Neste tipo de clima, o período mais quente ocorre durante a primavera e o verão, e observa-se uma queda de temperatura no inverno; em relação ao período chuvoso, observa-se uma redução pluviométrica durante o inverno prolongado (maio a setembro) e as chuvas são concentradas entre outubro e abril, durante o verão prolongado (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). Os climogramas para as principais regiões amostradas nesse bioma foram elaborados a partir de dados do INMET, entre os anos de 2000 e 2014 (Figura 3).

Figura 3 – Climogramas de duas cidades no Cerrado representando o padrão termopluviométrico para o bioma. Média anual da temperatura mínima, máxima e precipitação.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

3.3 Maturidade e dimorfismo sexual

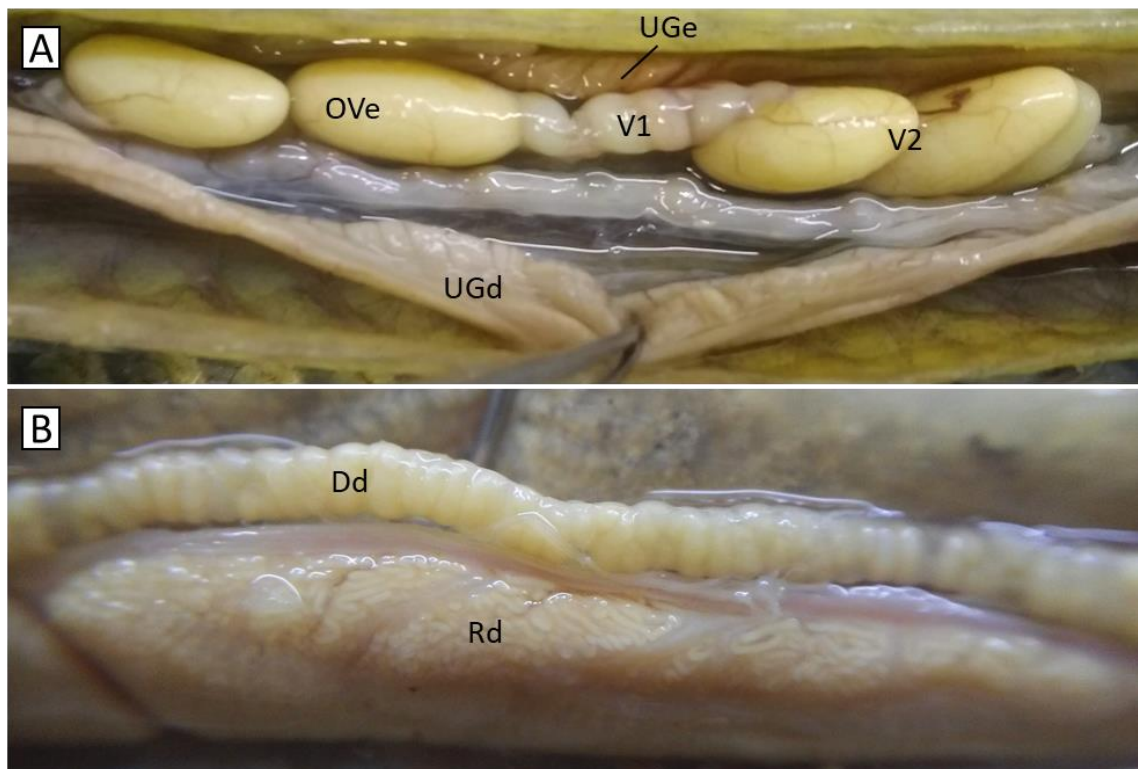
A maturidade sexual das fêmeas foi determinada por meio da observação de folículos vitelogênicos e/ou corpo albicans nos ovários, ovos nos ovidutos ou oviduto preguado e/ou distendido (i.e. pós-parto) (Figura 4A) e/ou, com a confirmação da histologia, a partir da presença de espermatozoides no trato reprodutivo (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Em relação aos machos, os indivíduos foram considerados maduros quando apresentaram os ductos deferentes enovelados (Figura 4B) e, após a análise histológica, presença de espermatozoides nos ductos deferentes, espermátides e/ou espermatozoides nos túbulos seminíferos e segmento sexual renal hipertrofiado (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

Para analisar a ocorrência de dimorfismo sexual, foram utilizados exemplares maduros de *C. bicarinatus*, *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, onde os seguintes dados morfométricos

foram coletados: (1) Comprimento rostro-cloacal (CRC); (2) Comprimento da cauda (CC); (3) Comprimento da cabeça (Ccab); (4) Largura da cabeça (Lcab); e (5) Altura da cabeça (Altcab). As medidas do CRC e CC foram coletadas com o auxílio de uma fita milimetrada com precisão de 0,5 mm. Para as demais medidas, foi utilizado um paquímetro digital com precisão de 0,1 mm.

Para comparar o índice de dimorfismo sexual de tamanho (SSD) entre indivíduos adultos, a seguinte formula foi utilizada: $(CRC \text{ médio dos adultos do sexo de maior tamanho} / CRC \text{ médio dos adultos do sexo de menor tamanho})$, seguindo o pressuposto de que se machos forem o sexo de maior tamanho, 1- é alocado no início da fórmula, e se as fêmeas forem o sexo de maior tamanho, -1 é alocado no final da fórmula, de acordo com Shine (1994). Este índice se trata de um valor arbitrário e, quando apresentado como negativo, indica que machos são maiores que as fêmeas, ao passo que valores positivos indicam o oposto.

Figura 4 – Maturidade sexual em fêmeas e machos de *Chironius*. A) Fêmea madura de *C. bicarinatus* em vitelogênese secundária e com o oviduto pregueado. B) Macho maduro de *C. bicarinatus* com ducto deferente enovelado. OVe = ovário esquerdo; UGd = útero glandular direito; UGe = útero glandular esquerdo; V1 = folículos pré-vitelogênicos; V2 = folículos vitelogênicos; Dd = ducto deferente direito; Rd = rim direito.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

3.4 Caracterização do ciclo reprodutivo

Para a caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas, foi realizada uma incisão longitudinal ventral acima da cloaca até um terço do comprimento rostro-cloacal para inspeção da anatomia macroscópica e microscópica do trato reprodutivo (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). As medidas macroscópicas foram tomadas com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,1 mm.

3.4.1 Análise macroscópica: Morfometria linear

Para as fêmeas foram coletados os seguintes dados morfológicos: (1) estágio folicular – folículo pré-vitelogênico (V1) ou folículo vitelogênico (V2); (2) quantidade de folículos em V2 e/ou ovos nos ovidutos; (3) comprimento do maior folículo ovariano e/ou ovo. Para caracterizar o ciclo reprodutivo das fêmeas de cada espécie foi realizada a construção de um gráfico de distribuição dos folículos e/ou ovos, a partir das medidas de comprimento coletadas, ao longo do ano no Microsoft Excel. De acordo com Muniz-Da-Silva (2016) a visualização/formação da UMC pode ser classificada macroscopicamente em: UMC forte – na pré-fixação (i.e. material a fresco) se apresenta forte e é facilmente visualizada através da serosa parietal (Figura 5A), já na pós-fixação (i.e. material fixado em formaldeído 10%) se apresenta fraca (Figura 5C). UMC fraca – na pré-fixação se apresenta fraca e vista somente após a dissecação da serosa parietal (Figura 5B), e na pós-fixação não é visto e apresenta aspecto liso (Figura 5D). UMC ausente – na pré e pós-fixação a visibilidade é inexistente e a junção útero-vaginal apresenta aspecto liso (semelhante a Figura 5D). No presente estudo, avaliando macroscopicamente, a presença da UMC foi considerada quando foi observada pequenas dobras na porção da junção útero-vaginal.

De acordo com a literatura (DIXON et al., 1993; MARQUES, 1998; RIBEIRO DA COSTA et al., 2005; MARQUES et al., 2009) o comprimento rostro-cloacal dos filhotes de *C. bicarinatus* e *C. laevicollis* ao nascer varia de aproximadamente 241 a 300 mm e 230 a 295 mm, respectivamente. Para *C. flavolineatus* a literatura fornece apenas informações do menor indivíduo coletado com CRC de 233 mm (DIXON et al., 1993). Portanto, exemplares da amostra que possuíam comprimento em torno destes valores foram considerados filhotes recém-nascidos. Dessa forma, o período de recrutamento de filhotes foi estimado a partir da distribuição de filhotes recém nascidos nos meses do ano (MARQUES et al., 2013).

Para os machos foram registrados os seguintes dados: (1) comprimento, largura e espessura dos testículos direito e esquerdo; (2) aspecto do ducto deferente (enovelado ou liso); e (3) o diâmetro dos ductos deferentes direito e esquerdo na porção mais caudal. Para calcular o volume testicular a seguinte fórmula foi utilizada: $VT = 4/3 \pi (a/2) (b/2) (c/2)$, onde a =

comprimento do testículo, b = largura e c = espessura (SHINE, 1980). O volume testicular foi utilizado como indicador da atividade espermatogênica (FOX, 1956, SHINE, 1977A; VOLSOE, 1944).

Figura 5 – Classificação da visualização/formação da UMC macroscopicamente. A) forte e B) fraca (pré-fixação); C) forte e D) fraca (pós-fixação em formaldeído 10%). umt = *uterine muscular twisting* (antiga classificação), vge = vagina esquerda, setas indicam a serosa parietal.



Fonte: MUNIZ-DA-SILVA (2016)

3.4.2 Análise microscópica: Histologia

Foram coletados fragmentos teciduais do trato reprodutivo de machos e fêmeas para análise em microscopia óptica de luz. Para as três espécies foi padronizada a coleta do lado direito do trato reprodutivo em ambos os sexos. Nos machos foram coletados: um fragmento da porção mais caudal do testículo, um fragmento da região mais caudal do ducto deferente e um fragmento da porção mais caudal do rim, com o intuito de caracterizar o estágio da espermatogênese e o estágio da hipertrofia do SSR e verificar a estocagem de espermatozoides. Nas fêmeas foram coletados: um fragmento do infundíbulo posterior, um fragmento do útero glandular, um fragmento da junção útero-vaginal, um fragmento da vagina e um fragmento do ovário, na finalidade de avaliar as estruturas de estocagem de espermatozoides, a hipertrofia

das glândulas uterinas, a presença de espermatozoides na vagina e a deposição de vitelo nos folículos ovarianos.

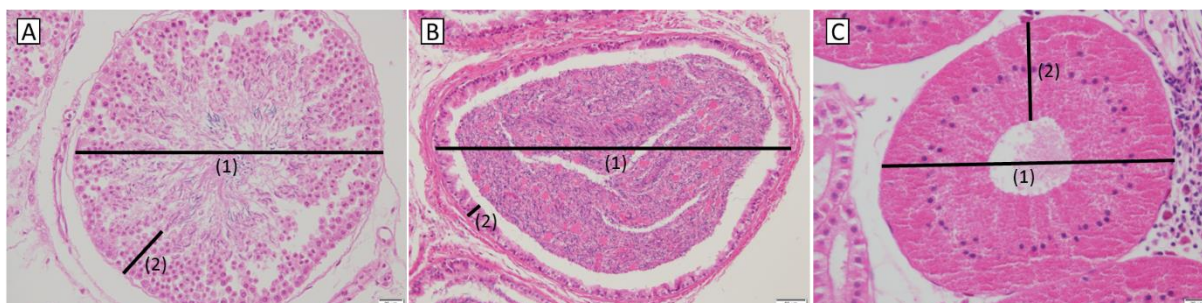
As amostras coletadas, previamente fixados em formol 10% e mantidos em solução de etanol 70%, passaram pelo processo de desidratação em série crescente de etanol (80%, 90% e 100%) e diafanização em xilol fracionado e xilol puro, seguido de inclusão em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram feitos em micrótomo LEICA®, modelo 2165 e em seguida submetidos à coloração básica com hematoxilina-eosina (HE) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Do trato reprodutivo masculino, as estruturas morfológicas medidas microscopicamente após o preparo das lâminas histológicas foram: (1) diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero nos cortes do testículo (Figura 6A); (2) diâmetro e altura do epitélio do ducto deferente (Figura 6B); e (3) diâmetro e altura do epitélio do segmento sexual renal (SSR; Figura 6C), para quantificar a variação destas estruturas, caracterizar os estágios da espermatogênese e da hipertrofia do SSR ao longo das estações do ano, de acordo com a Tabela 2 e 3 respectivamente (MELO et al., 2019; SILVA et al., 2020). Do sistema reprodutor feminino, as estruturas morfológicas medidas microscopicamente após o preparo das lâminas histológicas foram: (1) altura da camada da granulosa (Figura 7A); (2) altura do epitélio do infundíbulo posterior (Figura 7B); (3) altura do epitélio uterino e (4) diâmetro das glândulas uterinas (Figura 7C), para quantificar a variação destas estruturas de acordo com o estágio reprodutivo do indivíduo (pré-vitelogênese, vitelogênese) e ao longo das estações do ano (SOUZA; ALMEIDA-SANTOS, 2022). Foram feitas de 5 a 10 medições das estruturas mencionadas anteriormente, para ambos os sexos (MELO et al., 2019; SILVA et al., 2020; SOUZA; ALMEIDA-SANTOS, 2022). A partir disso, para cada exemplar foram calculadas suas médias e posteriormente essas médias foram utilizadas para estimar uma média geral por estação (BRAZ et al., 2018).

Ainda com base no estudo de Muniz-Da-Silva (2016), a visualização/formação da UMC pode ser classificada microscopicamente em: UMC forte – (helicoide de hélice longa) é vista como duas colunas paralelas com vários cortes transversais formados pela mucosa e lúmen do oviduto (Figura 8A, B). UMC fraca – (helicoide de hélice curta) o lúmen do oviduto é visto em formato ondular (Figura 8C). UMC ausente – (não forma helicoide) a camada muscular circular interna, mucosa e lúmen do oviduto formam um tubo retilíneo (Figura 8D). No presente estudo, avaliando microscopicamente, a formação da UMC foi considerada quando foi observado aspectos das classificações da UMC forte ou fraca.

A preparação histológica das amostras foi realizada no Laboratório de Ecologia e Evolução, Laboratório de Biologia Estrutural e Laboratório de Citogenética localizados no Instituto Butantan, além do laboratório particular “Histológica – Consultoria em Histotecnologia e Anatomia Patológica”. As medidas microscópicas foram feitas em aumento 20x, as fotografias foram realizadas por meio de um Microscópio Olympus BX 51, acoplado a câmera digital Olympus DP73 e software de imagem cellSens, no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan.

Figura 6 – Medidas microscópicas coletadas para os machos (hematoxilina-eosina, 40x). A) Túbulo seminífero em corte longitudinal do testículo; B) Ducto deferente em corte longitudinal; C) Segmento Sexual Renal (SSR) em corte longitudinal do rim. (1) = diâmetro da estrutura, (2) = altura do epitélio da estrutura.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

Tabela 2 – Classificação dos túbulos seminíferos nos estágios da espermatogênese.

Estágio	Descrição do túbulo seminífero
1	Quiescência: Inatividade testicular, túbulos seminíferos revestidos apenas por espermatogônias e células de Sertoli – pode haver espermatozoides remanescentes no lúmen.
2	Recrudescência (Reativação): Aumento das divisões celulares, primeira e segunda fase meiótica (formação dos espermatócitos e espermátides, respectivamente).
3	Espermio gênese: Pico de atividade testicular, espermátides em metamorfose, formando os espermatozoides e liberação dos mesmo no lúmen (espermição).
4	Regressão: Epitélio germinativo reduzido (poucas espermatogônias, espermatócitos e espermátides) e pode haver poucos espermatozoides no lúmen.

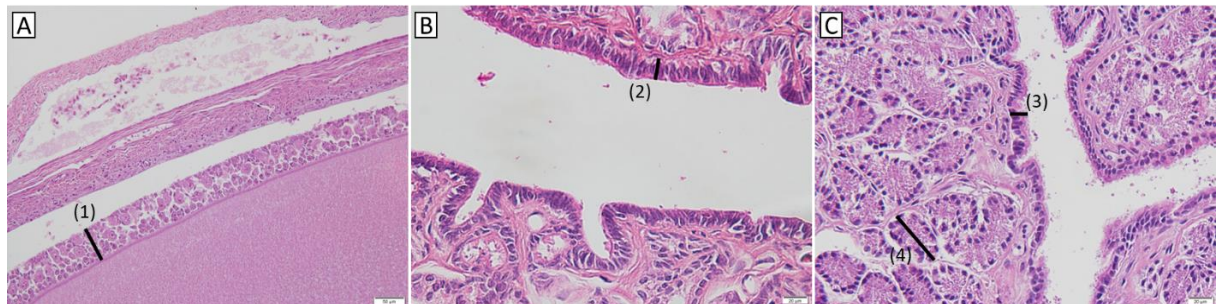
Fonte: Adaptado de Fitch (1970), Goldberg e Parker (1975) e Gribbins (2011).

Tabela 3 – Classificação dos estágios da hipertrofia do segmento sexual renal.

Estágio	Descrição do SSR
1	SSR hipertrofiado com poucos grânulos secretores no citoplasma e nenhum no lúmen.
2	SSR hipertrofiado com alguns grânulos secretores concentrados próximo ao núcleo, região apical das células.
3	SSR hipertrofiado com muitos grânulos secretores na região apical, mas nenhum no lúmen.
4	SSR hipertrofiado em nível máximo, com muitos grânulos secretores no citoplasma e no lúmen.

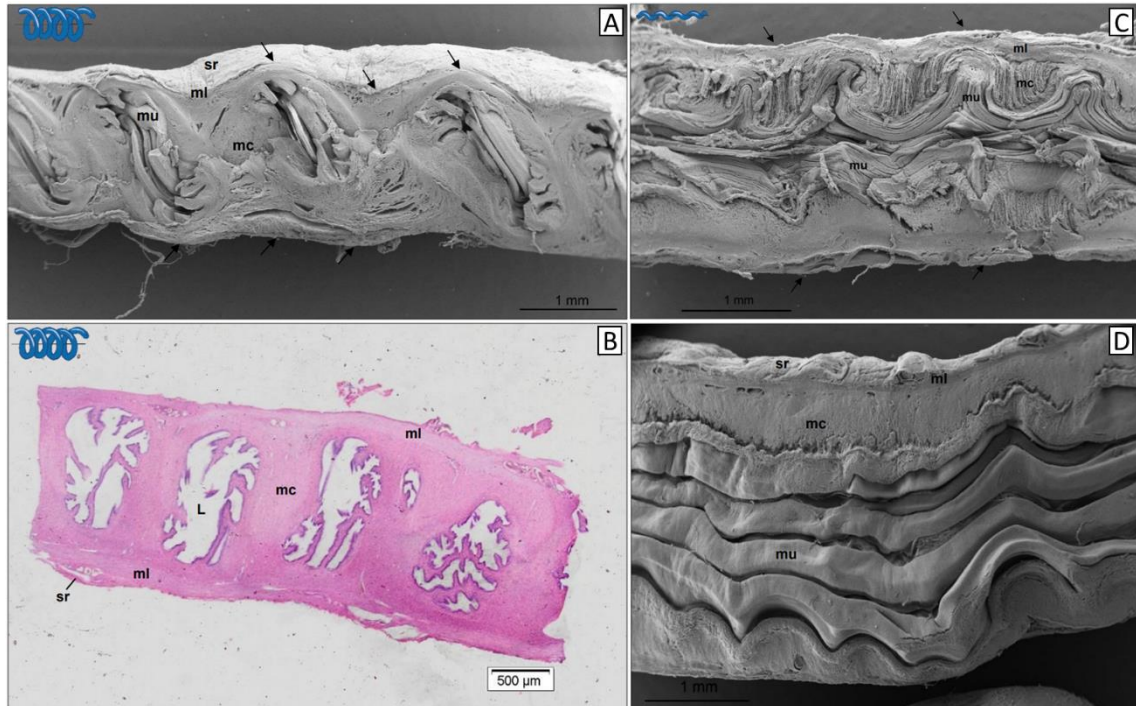
Fonte: Adaptado de Krohmer (2004) e Silva et al. (2020).

Figura 7 – Medidas microscópicas coletadas para as fêmeas (hematoxilina-eosina). A) Folículo vitelogênico em corte longitudinal do ovário (20x), (1) = altura da camada da granulosa; B) Infundíbulo posterior em corte longitudinal (40x), (2) = altura do epitélio infundibular; C) Útero glandular em corte longitudinal (40x), (3) = altura do epitélio uterino, (4) = diâmetro das glândulas uterinas.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 8 – Classificação da visualização/formação da UMC microscopicamente. A) forte (microscopia de varredura); B) forte (hematoxilina-eosina); C) fraca (microscopia de varredura) e D) ausente (microscopia de varredura). L = lúmen, mc = camada muscular circular interna, ml = camada muscular longitudinal externa, mu = mucosa, sr = serosa, setas indicam o aspecto da borda do órgão ondular em (A) e retilíneo em (B).



Fonte: MUNIZ-DA-SILVA (2016)

3.5 Comportamentos reprodutivos

Foi realizada uma compilação de informações, tanto com dados da literatura quanto dados inéditos, sendo neste último fornecidos por terceiros, referente aos comportamentos reprodutivos dos modelos de estudo, tais como: combates, cortes e cópulas. Foram tomados dados de localidade e data, quando disponível, para relacionar aos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas.

3.6 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foram utilizados testes paramétricos ou testes equivalentes não paramétricos, e quando necessário, os dados foram transformados em Log_{10} , definidos a partir da normalidade e homogeneidade do número amostral (ZAR, 1999). As diferenças foram significativas quando $p < 0,05$. Para realização das análises e gráficos foi utilizado o software R versão 4.3.0 no RStudio versão 2023.03.1+446.

Para a comparação estatística da sazonalidade dos eventos reprodutivos de machos e fêmeas das três espécies foi utilizada a classificação para o hemisfério sul de Trenberth (1983) para a separação dos dados em quatro estações do ano, sendo elas: Verão (22 de dezembro a 21 de março), Outono (21 de março a 22 de junho), Inverno (22 de junho a 23 de setembro) e Primavera (23 de setembro a 22 de dezembro).

Para a inferência do padrão de atividade das espécies, foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson para avaliar a probabilidade de casualidade na distribuição de machos e fêmeas ao longo do ano. Os dados foram agrupados em bimestres para as três espécies.

Para análise da ocorrência de dimorfismo sexual no tamanho do comprimento rostro-cloacal (CRC) foi utilizado o teste-t para comparação das médias de machos e fêmeas. Para o comprimento da cauda (CC), comprimento, largura e altura da cabeça (Ccab, Lcab e Altcab, respectivamente), foi empregado o teste de correlação de Pearson, e quando a correlação se mostrou forte (≥ 0.7) foi dada sequência com a análise de covariância (ANCOVA) utilizando o CRC como covariável; quando a correlação se apresentou fraca ou moderada (< 0.7), foi realizado o teste-t ou seu equivalente não paramétrico, Mann Whitney Wilcoxon para comparação entre as médias de machos e fêmeas.

Para análise comparativa interespecífica, foi empregado análise de variância (ANOVA) para comparar o CRC e análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para comparar o CC, Ccab, Lcab e Altcab, utilizando o CRC como covariável. Para avaliar diferenças entre pares de espécies, foi empregado o teste *a posteriori* de Bonferroni. Os sexos foram analisados separadamente com o intuito de evitar ruídos, tal como a presença do músculo retrator do hemipênis nos machos influenciando em uma cauda maior neste sexo (MARTINS et al., 2001).

Para *C. bicarinatus*, a comparação das medidas da variação do comprimento e volume testicular, foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA); e para diâmetro do ducto deferente foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para *C. flavolineatus*, as medidas do comprimento e volume testicular foram comparadas por meio de análise de covariância (ANCOVA), utilizando o CRC como covariável. Já para as medidas do diâmetro do ducto deferente, foi realizada análise de variância (ANOVA) para comparação entre as médias das estações. Para *C. laevicollis*, as medidas do comprimento testicular e diâmetro do ducto deferente foram avaliadas por meio de análise de covariância (ANCOVA), utilizando o CRC como covariável. Já para o volume testicular, as medidas foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA). Para as três espécies, as medidas da variação do diâmetro do ducto deferente entre os lados, direito e esquerdo, foi avaliada por meio do teste-t ou pelo seu equivalente não paramétrico, Mann Whitney Wilcoxon, para comparação entre as médias.

Para analisar a variação das medidas microscópicas do túbulo seminífero, ducto deferente e o segmento sexual renal (SSR) também foi utilizada análise de variância (ANOVA) para comparação entre as estações.

A fecundidade foi estimada pela contagem do número de folículos vitelogênicos ou ovos nos ovidutos de fêmeas reprodutivas. Foi realizada análise de covariância (ANCOVA), utilizando o CRC como covariável, para investigar a diferença entre o número de folículos e o número de ovos de uma mesma espécie. Análises de regressão linear foram utilizadas para determinar a relação entre o tamanho do corpo materno e a fecundidade, e entre o comprimento do maior folículo vitelogênico ou ovo e o tamanho do corpo materno. Para estimar a frequência reprodutiva, foi dividido o número de fêmeas reprodutivas pelo total de fêmeas sexualmente maduras. Fêmeas foram consideradas reprodutivas quando continham folículos vitelogênicos, ovos nos ovidutos e/ou corpos lúteos (indicando parto ou desova recente).

Para analisar a variação das medidas microscópicas da altura do epitélio infundibular e uterino, e diâmetro das glândulas uterinas, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) ou seu equivalente não paramétrico Kruskal-Wallis para comparação entre as estações, e a diferença entre as mesmas foi averiguada por meio do teste *a posteriori* de Tukey. Já para uma análise de acordo com o estágio reprodutivo de cada indivíduo (vitelogênese ou pré-vitelogênese), foi empregado o teste-t para comparação entre as duas médias. Para analisar a variação na altura da camada da granulosa de acordo com o estágio reprodutivo (vitelogênese ou pré-vitelogênese), foi empregado o teste-t para comparação entre as médias.

4 RESULTADOS

4.1 Espécimes amostrados e padrão de atividade

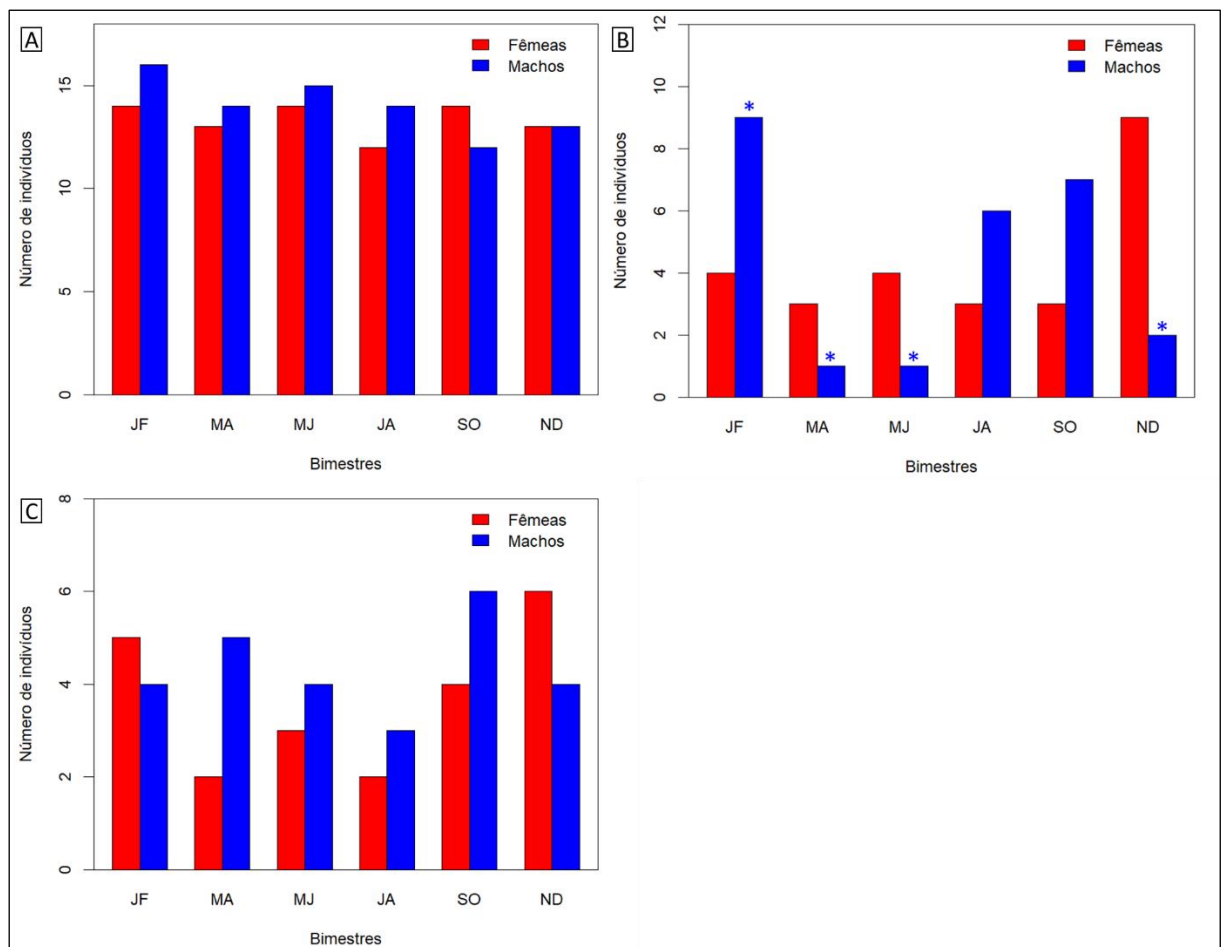
***Chironius bicarinatus*.** Foi utilizado um total de 164 indivíduos maduros, sendo 84 machos e 80 fêmeas. Não foi encontrada variação significativa no padrão de atividade dos indivíduos machos e fêmeas ao longo do ano (macho: $X^2_{(5)} = 0,71$; $p = 0,9822$; fêmea: $X^2_{(5)} = 0,25$; $p = 0,9985$; Figura 9A).

***Chironius flavolineatus*.** Foi avaliado um total de 52 indivíduos adultos, sendo 26 machos e 26 fêmeas. Para os machos, foi observada uma diferença significativa no número de indivíduos coletados no bimestre de janeiro/fevereiro ($X^2_{(5)} = 13,69$; $p = 0,0176$) em relação aos bimestres de março/abril, maio/junho e novembro/dezembro ($p = 0,011$; $p = 0,011$ e $p =$

0,035, respectivamente; Figura 9B). No caso das fêmeas, o número de indivíduos coletados durante o bimestre de novembro/dezembro foi superior aos demais bimestres do ano, embora não tenha sido significativo ($X^2_{(5)} = 6,3$; $p = 0,2774$).

***Chironius laevicollis*.** Foi analisado um total de 48 indivíduos maduros, sendo 26 machos e 22 fêmeas. O número de fêmeas coletadas entre setembro e fevereiro foi superior aos demais bimestres. Entretanto, para ambos os sexos não foi encontrada diferença significativa no padrão de atividade ao longo dos bimestres do ano (macho: $X^2_{(5)} = 1,23$; $p = 0,9419$; fêmea: $X^2_{(5)} = 3,63$; $p = 0,6029$; Figura 9C).

Figura 9 – Distribuição do número de machos e fêmeas de *Chironius* coletados ao longo do ano. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*. Eixo x representa os bimestres do ano: JF = janeiro/fevereiro; MA = março/abril; MJ = maio/junho; JA = julho/agosto; SO = setembro/ outubro; ND = novembro/dezembro; o eixo y apresenta o número de indivíduos coletados ao longo dos meses do ano. Barras vermelhas = fêmeas; barras azuis = machos. Barras vermelhas = fêmeas; barras azuis = machos; (*) = diferença observada estatisticamente.



Fonte: Araújo G. S. 2023

4.2 Maturidade e dimorfismo sexual

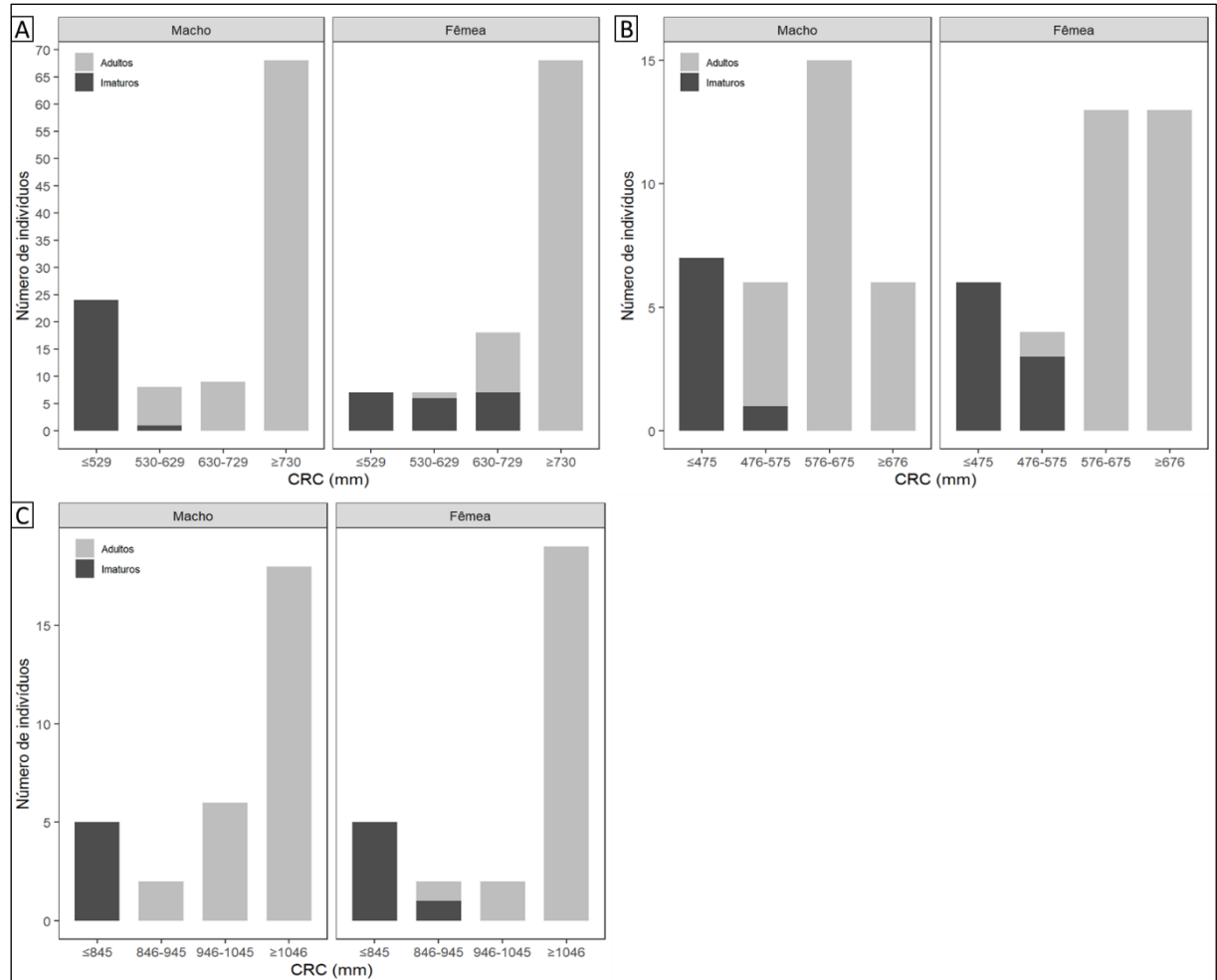
4.2.1 Maturidade sexual

***Chironius bicarinatus*.** O menor macho sexualmente maduro media 530 mm de CRC, apresentando ductos deferentes enovelados com espermatozoides no lúmen. Em relação às fêmeas, o menor indivíduo maduro media 600 mm de CRC e apresentou folículos vitelogênicos de 24,43 mm. Em ambos os sexos foi observada uma variação na maturidade dos indivíduos analisados, onde foram encontrados machos e fêmeas imaturas com mais de 530 mm e 600 mm, respectivamente (Figura 10A).

***Chironius flavolineatus*.** O menor macho sexualmente maduro media 499 mm de CRC, com os túbulos seminíferos em atividade e ductos deferentes enovelados e estocando espermatozoides. Já a menor fêmea madura media 517 mm de CRC (Figura 10B) e apresentou folículos vitelogênicos de 8 mm.

***Chironius laevicollis*.** O menor macho sexualmente maduro media 850 mm de CRC, apresentando os ductos deferentes enovelados e com espermatozoides no lúmen. A menor fêmea sexualmente madura media 941 mm de CRC, apresentando folículos pré-vitelogênicos e oviduto pregueado (Figura 10C).

Figura 10 – Número de machos e fêmeas apresentados de acordo com a maturidade sexual. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*. Eixo x representa o comprimento rostro-cloacal em milímetros de todos os indivíduos amostrados; eixo y representa o número de indivíduos. Barras escuras representam indivíduos imaturos e barras claras representam indivíduos adultos.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.2.2 Dimorfismo sexual

A tabela 4 apresenta os dados morfológicos que foram utilizados para análise de dimorfismo sexual nas três espécies estudadas.

Tabela 4 – Médias $\pm$ desvio padrão, valores mínimo e máximo e n amostral das medidas morfológicas dos indivíduos maduros machos e fêmeas de *Chironius*. CRC = comprimento rostro-cloacal, CC = comprimento da cauda, Ccab = comprimento da cabeça, Lcab = largura da cabeça, Altcab = altura da cabeça.

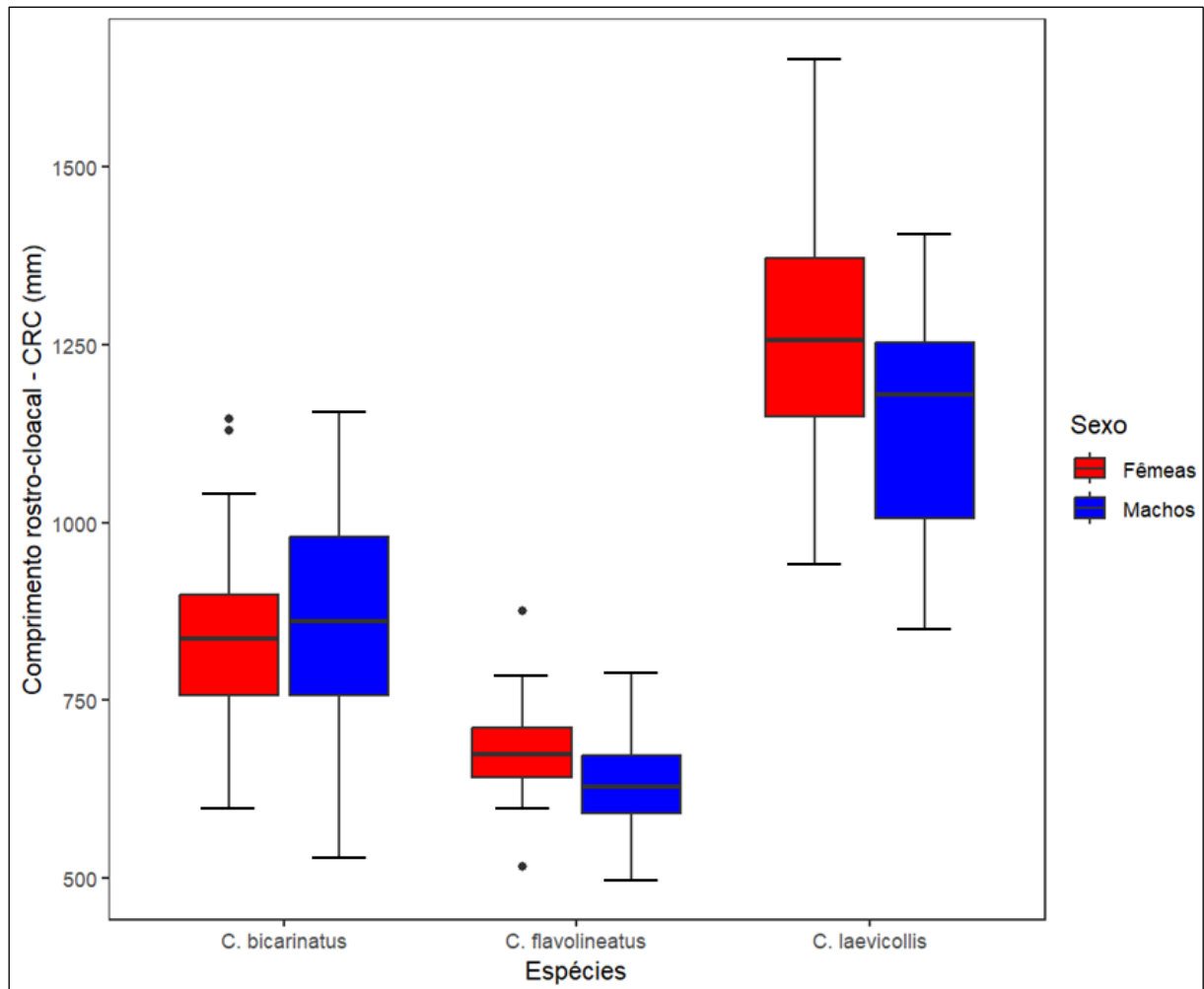
Espécie	Sexo	Variável (mm)				
		CRC	CC	Ccab	Lcab	Altcab
<i>C. bicarinatus</i>	Macho	862,058 $\pm$ 164,93 (530 - 1156) $n=85$	497 $\pm$ 97,42 (251 - 667) $n=76$	30 $\pm$ 4,68 (16,07 - 39,02) $n=83$	14,45 $\pm$ 2,66 (10,46 - 19,73) $n=75$	10,66 $\pm$ 2,04 (7,75 - 15,07) $n=32$
	Fêmea	838,78 $\pm$ 113,54 (600 - 1145) $n=80$	489,47 $\pm$ 64,27 (367 - 685) $n=70$	29,36 $\pm$ 3,51 (22,72 - 38,24) $n=80$	14,42 $\pm$ 2,15 (10,04 - 19,82) $n=76$	11,32 $\pm$ 1,65 (7,55 - 14,88) $n=41$
<i>C. flavolineatus</i>	Macho	634,8 $\pm$ 74,37 (499 - 789) $n=26$	408,73 $\pm$ 56,88 (309 - 548) $n=23$	22,8 $\pm$ 2,32 (18,6 - 27,92) $n=24$	9,96 $\pm$ 1,3 (8 - 13,02) $n=23$	7,8 $\pm$ 1,04 (5,4 - 9,41) $n=21$
	Fêmea	678,74 $\pm$ 64,49 (517 - 876) $n=27$	413 $\pm$ 28,21 (350 - 456) $n=23$	23,45 $\pm$ 1,64 (21 - 29,21) $n=25$	10,92 $\pm$ 1,39 (7,71 - 14,11) $n=25$	8,06 $\pm$ 0,86 (5,88 - 9,62) $n=24$
<i>C. laevicollis</i>	Macho	1144,33 $\pm$ 158,84 (850 - 1404) $n=27$	522,17 $\pm$ 64,22 (401 - 597) $n=23$	45,27 $\pm$ 4,6 (36,96 - 53,66) $n=25$	22,54 $\pm$ 3,66 (13,3 - 30,62) $n=25$	16,61 $\pm$ 3,01 (11,42 - 20,46) $n=25$
	Fêmea	1254,36 $\pm$ 175,58 (941 - 1650) $n=20$	544,1 $\pm$ 70,66 (382 - 642) $n=20$	48,48 $\pm$ 4,67 (38,6 - 56,93) $n=22$	25,53 $\pm$ 3,39 (18,95 - 31,76) $n=22$	17,98 $\pm$ 3,08 (11,47 - 24,72) $n=22$

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Tamanho do corpo (CRC). Não foi encontrado dimorfismo sexual entre indivíduos maduros de *C. bicarinatus* ($t_{(149,57)} = -1,0609$, $p = 0,2905$; Figura 11). As fêmeas de *C. flavolineatus* apresentaram tamanho corporal maior que os machos ($t_{(51)} = 2,3001$, $p = 0,0255$; Figura 11) e o mesmo padrão foi observado em *C. laevicollis* ($t_{(47)} = 2,3004$, $p = 0,0259$; Figura 11).

Na comparação interespecífica, *C. laevicollis* apresentou o maior CRC tanto em fêmeas (Kruskal-Wallis, $X^2_{(2)} = 77,229$, $p < 0,001$), como em machos (Kruskal-Wallis, $X^2_{(2)} = 70,143$, $p < 0,001$) e *C. flavolineatus* apresentou menor comprimento (Figura 11).

Figura 11 – Dimorfismo sexual no comprimento rostro-cloacal de indivíduos maduros machos e fêmeas de *Chironius*.

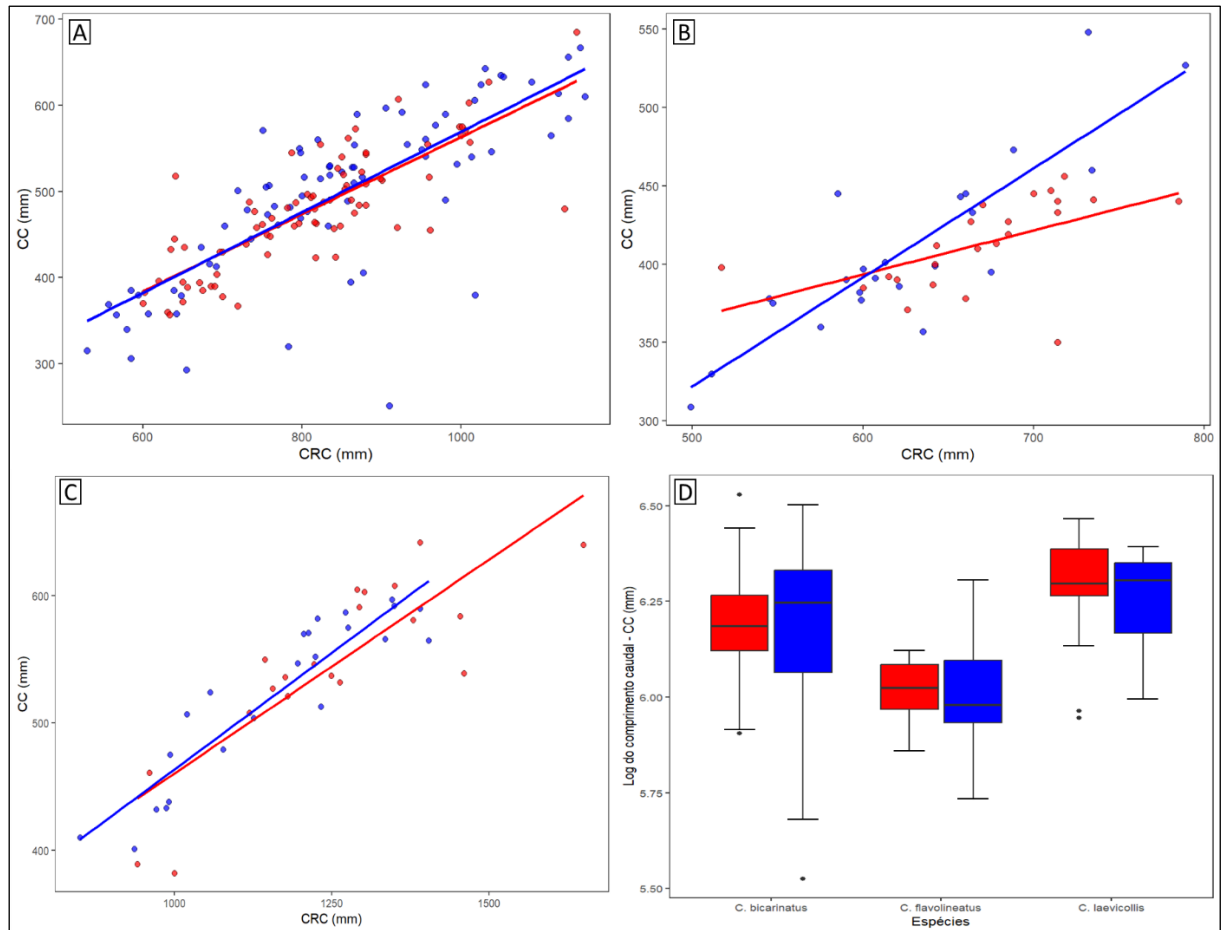


Fonte: Araújo, G. S. 2023

Tamanho da cauda (CC). Para *C. bicarinatus*, não foi observado dimorfismo sexual no comprimento da cauda (ANCOVA, $F_{(1,143)} = 0,7247$, $p = 0,396$; Figura 12A). Foi observada uma diferença significativa para *C. flavolineatus* (ANCOVA, $F_{(1,42)} = 9,9334$, $p = 0,0029$; Figura 12B) e *C. laevicollis* (ANCOVA, $F_{(1,40)} = 4,7826$, $p = 0,0346$; Figura 12C), onde os machos apresentaram caudas maiores que as fêmeas.

Na análise comparativa entre as espécies, as fêmeas de *C. laevicollis* apresentaram um maior comprimento comparado as demais espécies (ANCOVA, $F_{(2,109)} = 64,675$, $p < 0,001$). Os machos de *C. flavolineatus* apresentaram o menor comprimento caudal (ANCOVA, $F_{(2,118)} = 27,841$, $p < 0,001$). Não foi observado diferença no comprimento caudal entre os machos de *C. bicarinatus* e *C. laevicollis* ($p = 0,66$) (Figura 12D).

Figura 12 – Correlação entre o comprimento caudal e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual no comprimento da cauda (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de *Chironius*. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*. Linha e caixa vermelha = fêmeas, Linha e caixa azul = macho.

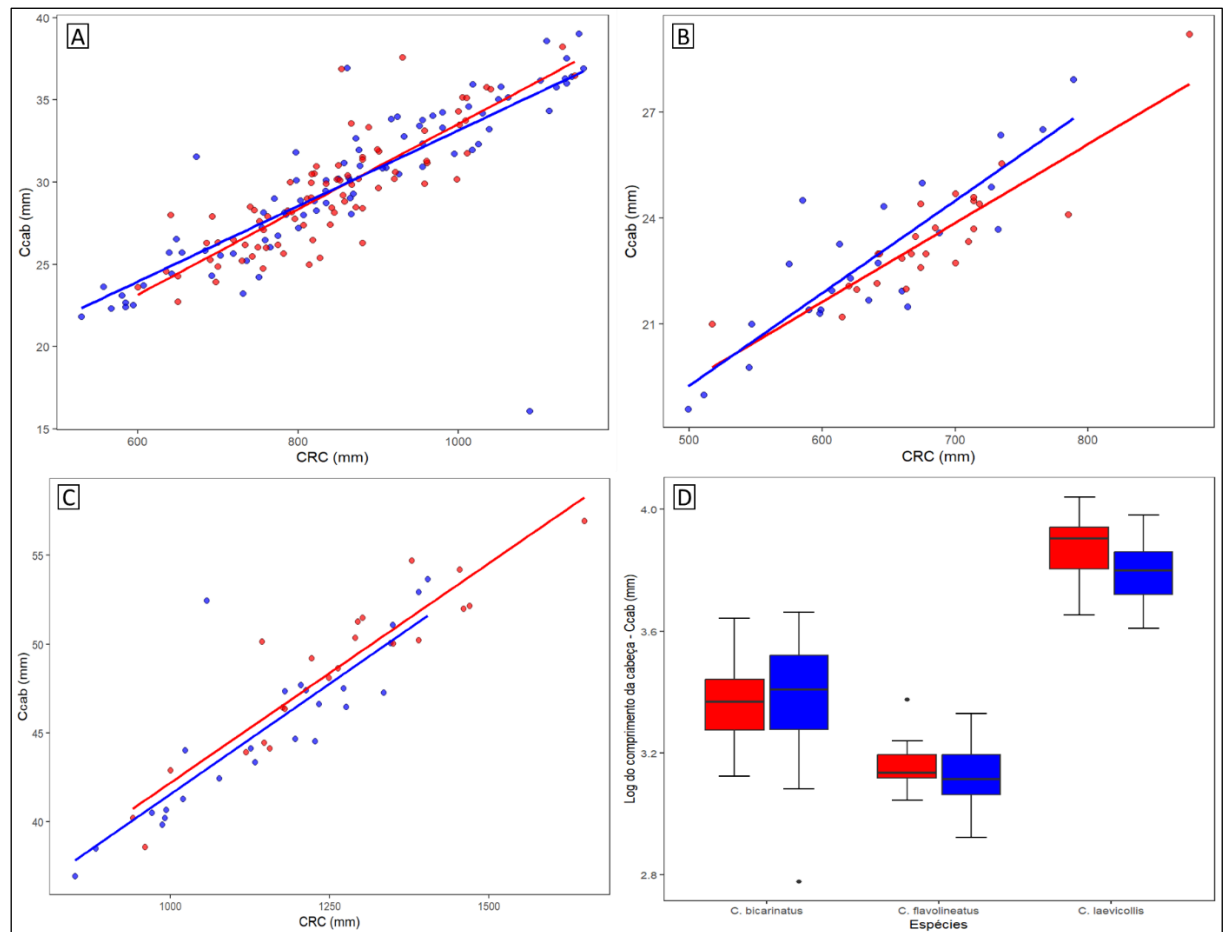


Fonte: Araújo, G. S. 2023

Comprimento da cabeça (Ccab). Não foi encontrado dimorfismo sexual no comprimento da cabeça (ANCOVA, $F_{(1,160)} = 3,0302$, $p = 0,0836$; Figura 13A) de *C. bicarinatus*. Já para *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, as fêmeas apresentaram tamanhos maiores que os machos (ANCOVA, $F_{(1,46)} = 5,1795$, $p = 0,0275$; Figura 13B) e (ANCOVA, $F_{(1,44)} = 26,509$, $p < 0,001$; Figura 13C), respectivamente.

Quando comparado entre espécies, *C. laevicollis* apresentou o maior comprimento da cabeça tanto em fêmeas (ANCOVA, $F_{(2,123)} = 1057,89$, $p < 0,001$) quanto em machos (ANCOVA, $F_{(2,128)} = 388,92$, $p < 0,001$) e *C. flavolineatus* o menor comprimento (Figura 13D).

Figura 13 – Correlação entre o comprimento da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual no comprimento da cabeça (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de *Chironius*. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*. Linha e caixa vermelha = fêmeas, Linha e caixa azul = macho.

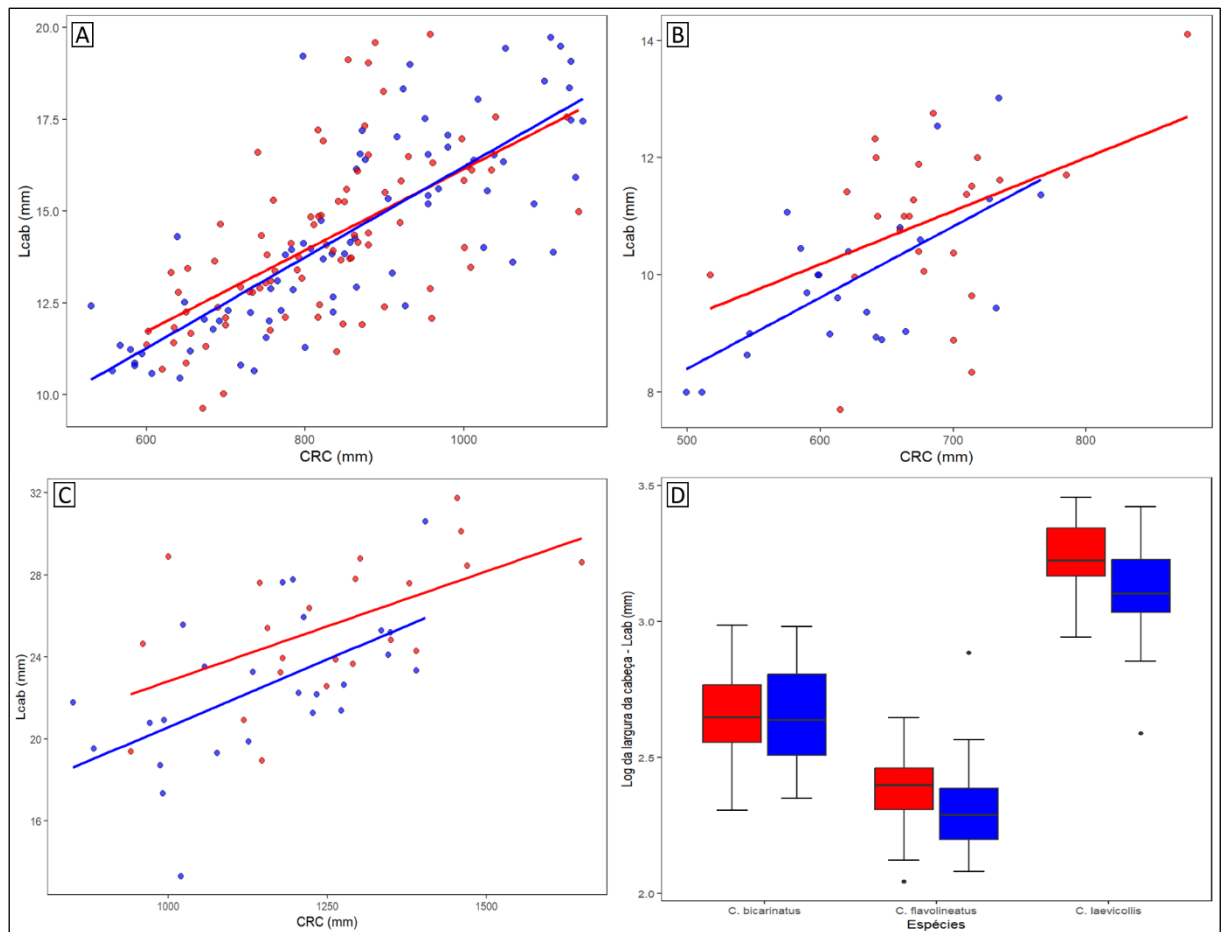


Fonte: Araújo, G. S. 2023

Largura da cabeça (Lcab). Para *C. bicarinatus*, também não foi encontrado dimorfismo sexual na largura da cabeça (ANCOVA, $F_{(1,157)} = 1,261$, $p = 0,2632$; Figura 14A). Os machos de *C. flavolineatus* apresentaram a largura da cabeça maiores que as fêmeas (ANCOVA, $F_{(1,45)} = 8,3164$, $p = 0,006$; Figura 14B). Já para *C. laevicollis*, fêmeas apresentaram larguras maiores que os machos (ANCOVA, $F_{(1,43)} = 25,9077$, $p < 0,001$; Figura 14C).

Chironius laevicollis apresentou novamente maior largura da cabeça tanto em fêmeas (ANCOVA, $F_{(2,119)} = 300,319$, $p < 0,001$) quanto em machos (ANCOVA, $F_{(2,120)} = 262,23$, $p < 0,001$) quando comparado as demais espécies (Figura 14D).

Figura 14 – Correlação entre a largura da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual na largura da cabeça (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de *Chironius*. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*. Linha e caixa vermelha = fêmeas, Linha e caixa azul = macho.

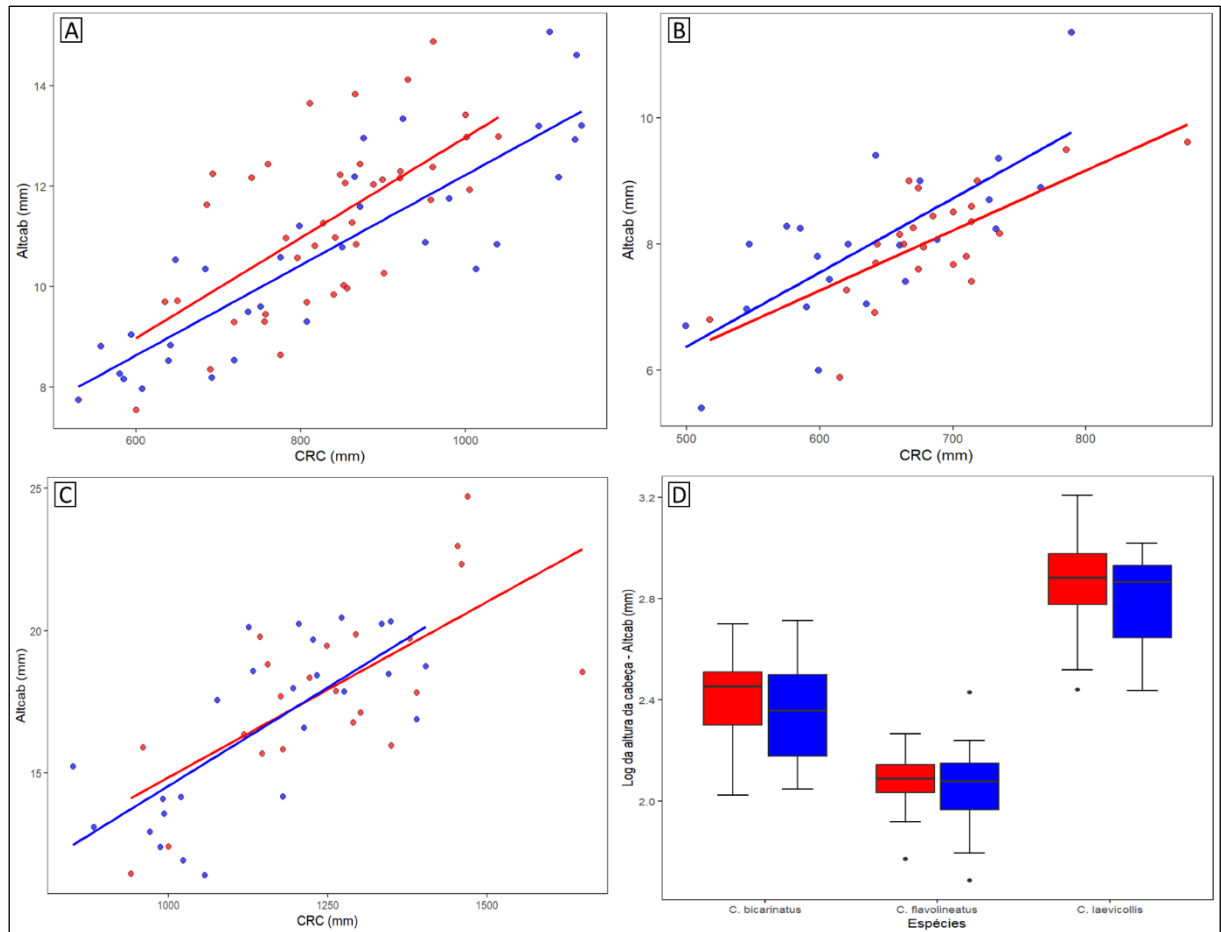


Fonte: Araújo, G. S. 2023

Altura da cabeça (Altcab). Fêmeas de *C. bicarinatus* apresentaram cabeças mais altas que os machos coespecíficos (ANCOVA, $F_{(1,70)} = 5,6807$, $p = 0,0198$; Figura 15A). Não foi observada diferença significativa entre a altura da cabeça de machos e fêmeas de *C. flavolineatus* (ANCOVA, $F_{(1,43)} = 0,1812$, $p = 0,6725$; Figura 15B). As fêmeas de *C. laevicollis* também apresentaram cabeças mais altas que os machos ANCOVA, $F_{(1,44)} = 4,7258$, $p = 0,0351$; Figura 15C).

Comparando as espécies, o padrão se repete como nos resultados do Ccab e Lcab, onde *C. laevicollis* apresenta maior altura da cabeça (ANCOVA, fêmeas: $F_{(2,83)} = 310,04$, $p < 0,001$; machos: $F_{(2,75)} = 250,82$, $p < 0,001$), ao passo que *C. flavolineatus* apresentou menores medidas (Figura 15D).

Figura 15 – Correlação entre a altura da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (A-C) e comparação do dimorfismo sexual na altura da cabeça (D) de indivíduos maduros machos e fêmeas de *Chironius*. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*. Linha e caixa vermelha = fêmeas, Linha e caixa azul = macho.

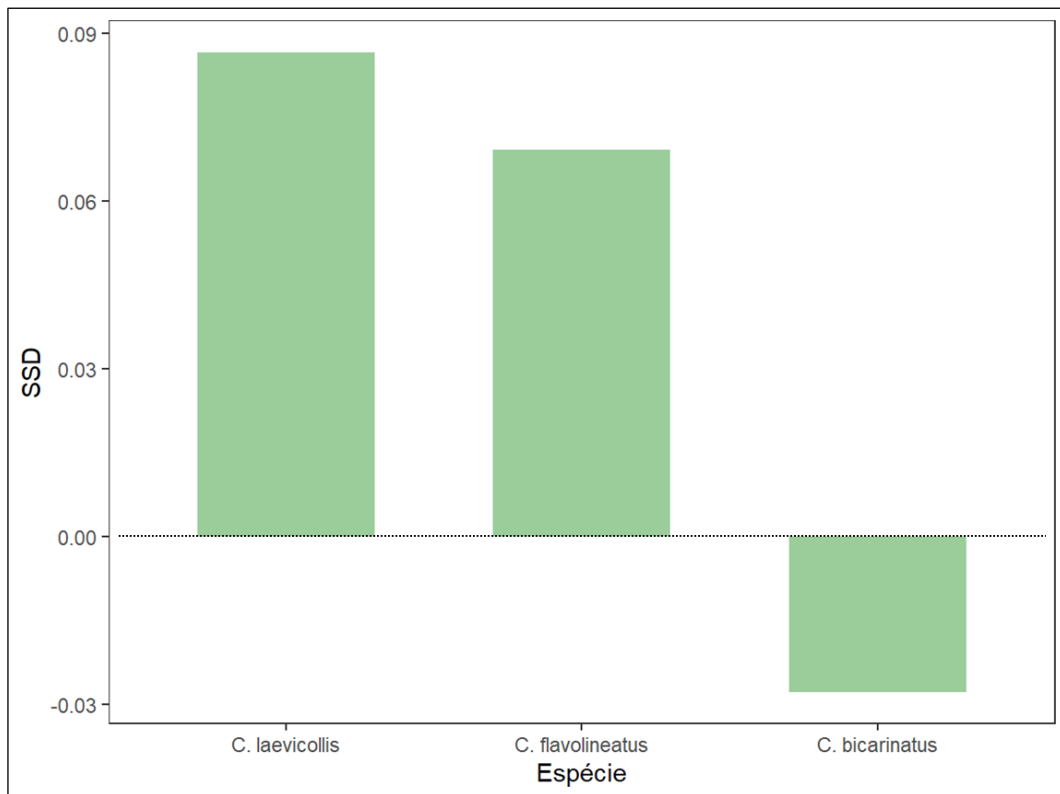


Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.2.3 Resumo do dimorfismo sexual de tamanho (SSD) nas três espécies

O índice de dimorfismo sexual no tamanho (SSD) da espécie *Chironius bicarinatus* foi de -0,027. Já em *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, o valor do índice foi de 0,069 e 0,086 respectivamente (Figura 16).

Figura 16 – Gráfico de comparação entre os índices de dimorfismo sexual de *Chironius*.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.3 Caracterização dos ciclos reprodutivos dos machos

4.3.1 Variação do comprimento, volume testicular e diâmetro do ducto deferente

***Chironius bicarinatus*.** Não foi encontrada nenhuma variação significativa no comprimento testicular (CT) (ANOVA, $F_{(3,70)} = 1,9089$, $p = 0,1361$), no volume testicular (VT) (ANOVA, $F_{(3,70)} = 0,6814$, $p = 0,5664$) e no diâmetro do ducto deferente (DDD) (Kruskal-Wallis, $X^2_{(3)} = 5,8757$, $p = 0,1178$) ao longo das estações (Tabela 5). Em relação a comparação das médias entre os ductos direito e esquerdo, também não foi encontrada variação significativa ($t_{(166)} = 0,93064$, $p = 0,3534$).

***Chironius flavolineatus*.** Foram encontradas variações significativas no comprimento (ANCOVA, $F_{(3,16)} = 5,5588$, $p = 0,0082$) e no volume testicular (ANCOVA, $F_{(3,16)} = 6,2121$, $p = 0,0053$) ao longo das estações, onde machos coletados no inverno apresentaram médias maiores que os machos coletados nas demais estações (Tabela 5). Não foi encontrada variação significativa no diâmetro do ducto deferente (ANOVA, $F_{(3,19)} = 2,2856$, $p = 0,1115$; Tabela 5) ao longo das estações, bem como na comparação entre as médias dos ductos deferentes direito e esquerdo (Wilcoxon = 254,5, $p = 0,778$).

***Chironius laevicollis*.** Não foi encontrada nenhuma variação significativa no volume testicular entre as estações (ANOVA, $F_{(3,18)} = 1,8123$, $p = 0,181$). Foi observado uma variação significativa no comprimento testicular (ANCOVA, $F_{(3,17)} = 10,503$, $p = 0,0003$) e no diâmetro do ducto deferente (ANCOVA, $F_{(3,20)} = 6,8381$, $p = 0,0023$) entre as estações, onde machos coletados na primavera apresentaram médias proporcionalmente maiores que os machos das demais estações (Tabela 5). Também foi observada uma variação significativa na comparação entre os lados ($t_{(46)} = 2,142$, $p = 0,0375$), sendo o ducto direito mais calibroso (3,15 mm) que o esquerdo (2,72 mm).

Tabela 5 – Médias $\pm$ desvio padrão, valores mínimo e máximo e n amostral das medidas morfológicas macroscópicas do trato reprodutivo dos machos de *Chironius*. CT = comprimento testicular, VT = volume testicular, DDD = diâmetro do ducto deferente.

Espécie	Variável	Estação			
		Primavera	Verão	Outono	Inverno
<i>C. bicarinatus</i>	CT (mm)	37,13 $\pm$ 8,81 (22,08 - 51,62) $n=18$	30,75 $\pm$ 6,44 (18,25 - 43,53) $n=18$	35,57 $\pm$ 10,57 (16,86 - 67,24) $n=21$	32,57 $\pm$ 8,95 (17,16 - 48,62) $n=17$
	VT (mm ³)	293,09 $\pm$ 166,76 (52,12 - 589,1) $n=18$	235,39 $\pm$ 127,21 (88,39 - 616,02) $n=18$	297,35 $\pm$ 149,71 (104,6 - 571,48) $n=21$	259,18 $\pm$ 181,48 (53,96 - 704,32) $n=17$
	DDD (mm)	1,93 $\pm$ 0,78 (0,56 - 3,32) $n=21$	1,61 $\pm$ 0,38 (1,07 - 2,65) $n=21$	1,68 $\pm$ 0,69 (0,62 - 2,93) $n=23$	2,03 $\pm$ 0,61 (0,79 - 3,32) $n=19$
<i>C. flavolineatus</i>	CT (mm)	23,33 $\pm$ 4,38 (17,8 - 27,68) $n=4$	21 $\pm$ 2,85 (17,42 - 25,8) $n=9$	24,94 $\pm$ 0,36 (24,69 - 25,2) $n=2$	28,19 $\pm$ 7,23 (19,32 - 39,76) $n=6$
	VT (mm ³)	226,06 $\pm$ 95,74 (83,88 - 283,27) $n=4$	131,89 $\pm$ 74,38 (53,68 - 252,59) $n=9$	166,49 $\pm$ 64,22 (121,07 - 211,9) $n=2$	292,75 $\pm$ 135,82 (148,1 - 510,19) $n=6$
	DDD (mm)	2,3 $\pm$ 0,89 (1 - 2,95) $n=4$	1,5 $\pm$ 0,57 (0,99 - 2,4) $n=11$	1,51 $\pm$ 0,91 (0,87 - 2,16) $n=2$	2,1 $\pm$ 0,41 (1,6 - 2,71) $n=6$
<i>C. laevicollis</i>	CT (mm)	56,82 $\pm$ 8,76 (44,29 - 69) $n=8$	41,34 $\pm$ 8,34 (31,17 - 50,48) $n=4$	52,61 $\pm$ 8,67 (41,91 - 68,02) $n=7$	47,6 $\pm$ 9,86 (37,99 - 57,7) $n=3$
	VT (mm ³)	1201,13 $\pm$ 553,35 (463,43 - 2179,5) $n=8$	654,8 $\pm$ 399,35 (302,28 - 1069,4) $n=4$	945,56 $\pm$ 390,01 (458,57 - 1699,5) $n=7$	658,76 $\pm$ 256,74 (461,76 - 949,1) $n=3$
	DDD (mm)	3,61 $\pm$ 0,83 (2,55 - 4,79) $n=8$	2,64 $\pm$ 0,6 (1,58 - 3,06) $n=5$	3,34 $\pm$ 0,51 (2,81 - 4,11) $n=7$	2,74 $\pm$ 0,99 (1,24 - 3,67) $n=5$

4.3.2 Ciclo espermatogênico

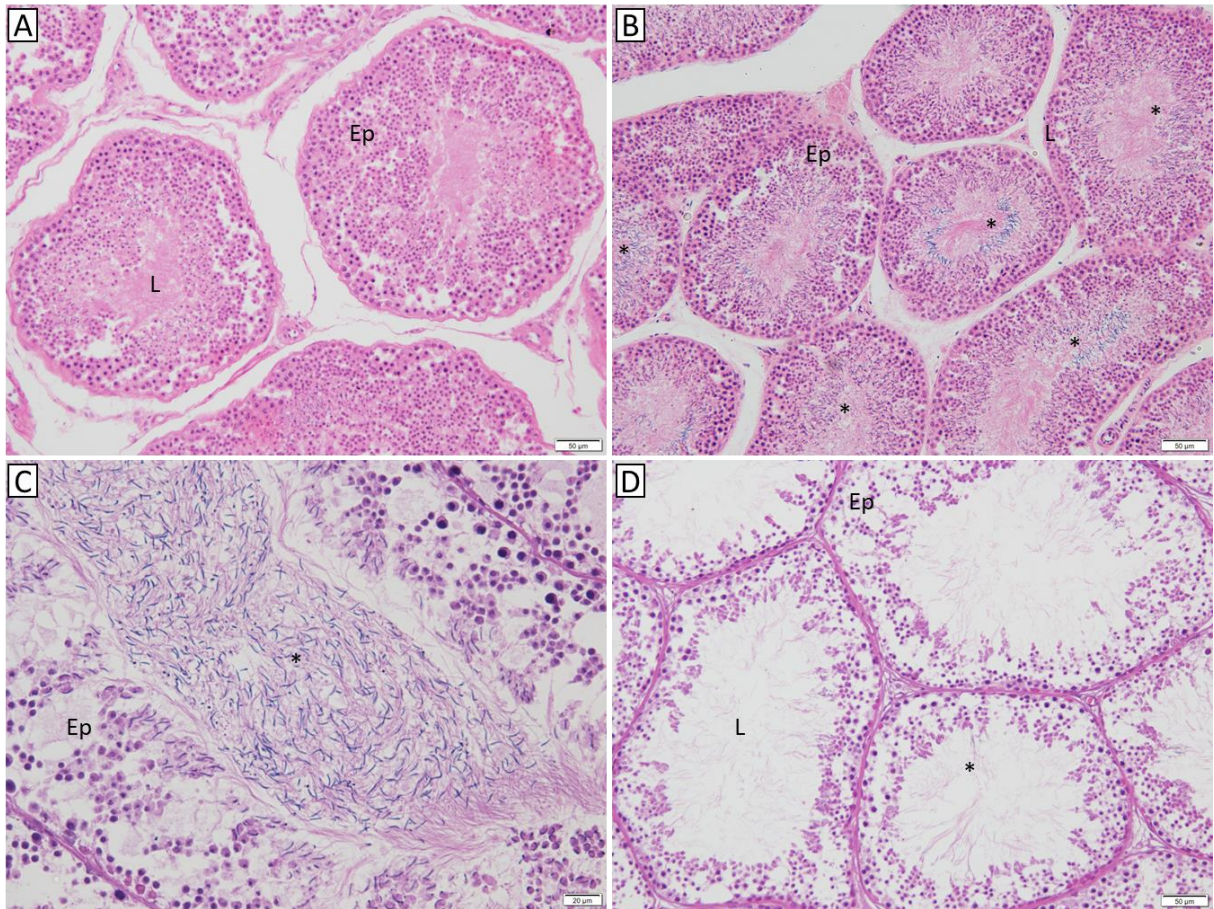
A tabela 6 apresenta todos os exemplares machos de *Chironius* que foram analisados para a classificação dos estágios da espermatogênese. A figura 17 exemplifica os três estágios observados para as espécies.

Tabela 6 – Número de exemplares distribuídos de acordo com cada estágio da espermatogênese nas estações do ano. 1 = Quiescência, 2 = Recrudescência, 3 = Espermiogênese, 4 = Regressão.

Estação	Estágio	Espécie		
		<i>C. bicarinatus</i>	<i>C. flavolineatus</i>	<i>C. laevicollis</i>
Primavera	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 4$	$n = 0$	$n = 0$
	3	$n = 6$	$n = 4$	$n = 7$
	4	$n = 2$	$n = 0$	$n = 1$
Verão	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 0$	$n = 0$	$n = 2$
	3	$n = 12$	$n = 7$	$n = 0$
	4	$n = 2$	$n = 1$	$n = 0$
Outono	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 0$	$n = 2$	$n = 0$
	3	$n = 8$	$n = 0$	$n = 4$
	4	$n = 9$	$n = 0$	$n = 2$
Inverno	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 1$	$n = 0$	$n = 1$
	3	$n = 4$	$n = 7$	$n = 1$
	4	$n = 4$	$n = 1$	$n = 0$
Total		52	22	18

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 17 – Ciclo espermatogênico de *Chironius* (hematoxilina-eosina). A) Recrudescência testicular – estágio 2 (*C. bicarinatus*, 20x); B) Espermiogênese – estágio 3 (*C. bicarinatus*, 20x); C) Espermiogênese (espermição) – estágio 3 em maior aumento (*C. flavolineatus*, 40x); D) Regressão testicular – estágio 4 (*C. laevicollis*, 40x). Ep = epitélio germinativo; L = lúmen; (*) = presença de espermatozoides.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

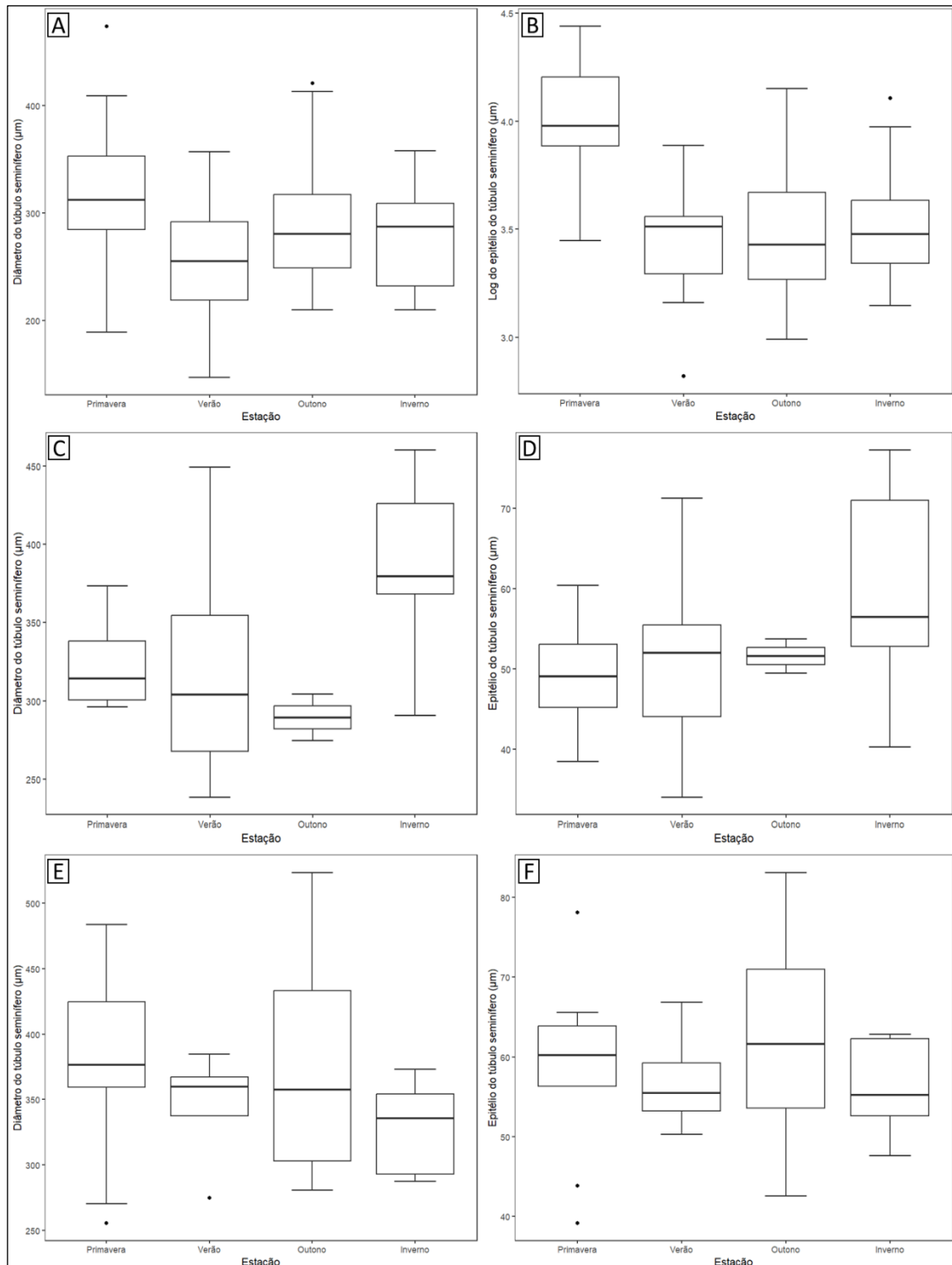
***Chironius bicarinatus*.** Para as medidas microscópicas, foi observada uma variação significativa no diâmetro do túbulo seminífero (ANOVA, $F_{(3,69)} = 3,279$, $p = 0,026$; Figura 18A), no qual o teste a posteriori de Tukey mostrou que a diferença está entre a amostra do verão e da primavera (Tukey, Verão-Primavera, $p = 0,0156$). Para a altura do epitélio do túbulo seminífero (ANOVA, $F_{(3,69)} = 16,39$, $p < 0,0001$; Figura 18B), o teste a posteriori de Tukey revelou que existe diferença significativa entre três estações: primavera e inverno (Tukey, Primavera-Inverno, $p < 0,0001$), primavera e outono (Tukey, Primavera-Outono, $p < 0,0001$) e primavera verão (Tukey, Primavera-Verão, $p < 0,0001$).

***Chironius flavolineatus*.** Embora a média dos valores do diâmetro do túbulo seminífero foram maiores no inverno em relação às demais estações, não foi significativo (ANOVA, $F_{(3,19)} = 2,7798$, $p = 0,06919$; Figura 18C). Também não foi observada variação significativa na altura do epitélio do túbulo seminífero (ANOVA, $F_{(3,19)} = 1,2034$, $p = 0,3354$; Figura 18D) ao longo das estações do ano.

***Chironius laevicollis*.** Não foi observada variação significativa tanto no diâmetro do túbulo seminífero (ANOVA, $F_{(3,21)} = 0,6211$, $p = 0,6091$; Figura 18E) quanto na altura do

epitélio do túbulo seminífero (ANOVA, $F_{(3,21)} = 0,3607$, $p = 0,782$; Figura 18F) entre as estações do ano.

Figura 18 – Média e variação do diâmetro e da altura do epitélio do túbulo seminífero dos machos de *Chironius*. A, B) *C. bicarinatus*; C, D) *C. flavolineatus*; E, F) *C. laevicollis*. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



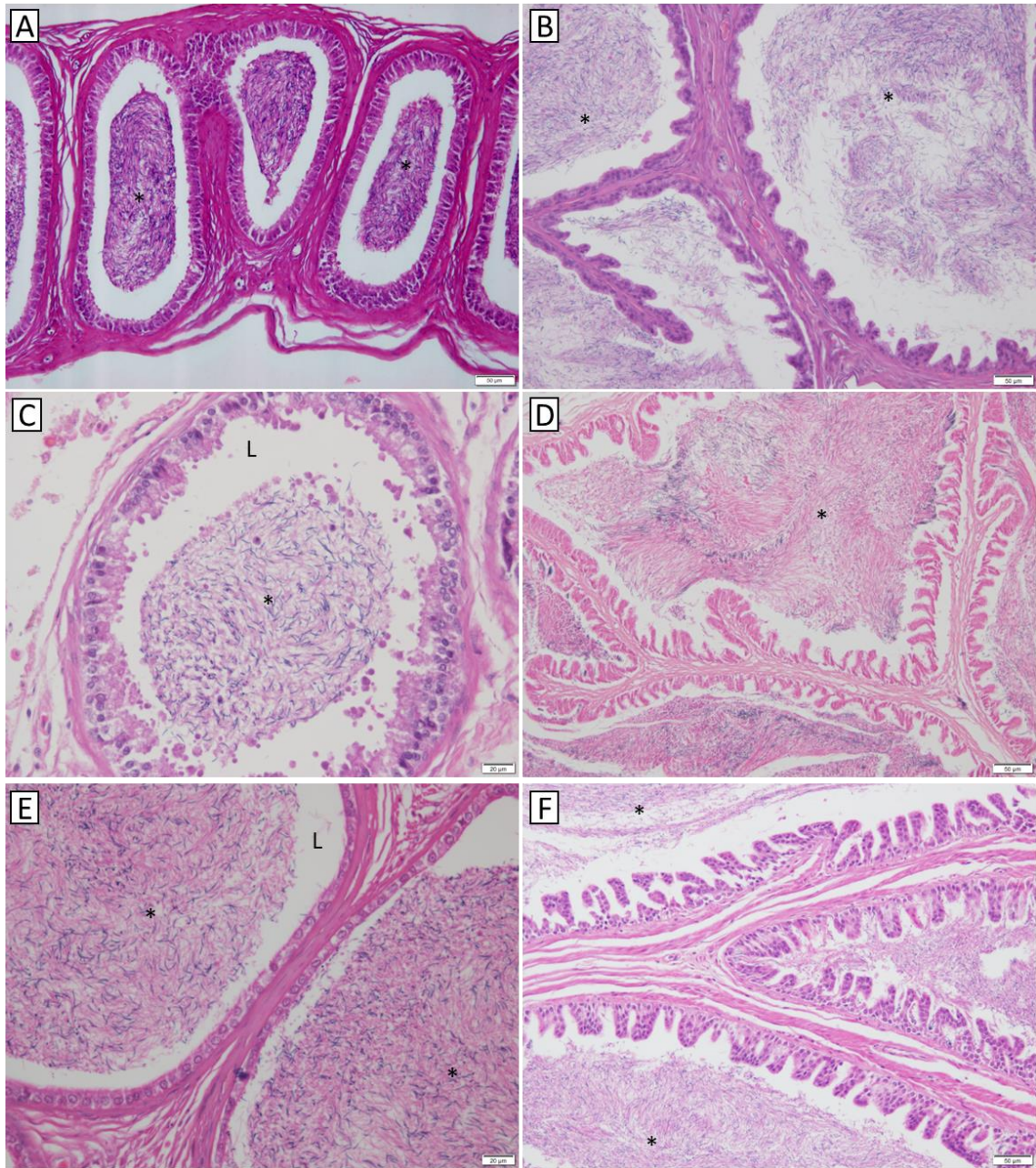
4.3.3 Estocagem e sazonalidade do ducto deferente

***Chironius bicarinatus*.** Foram analisados um total de 71 machos maduros (primavera $n = 16$; verão $n = 18$; outono $n = 20$; inverno $n = 17$) para análise da presença de estocagem de espermatozoides. A maioria dos machos examinados ($n = 70$) apresentaram estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes e apenas um macho, coletado durante a primavera, apresentou o ducto deferente sem espermatozoides no lúmen (Figura 19A). Foi observado uma modificação na porção distal do ducto deferente, em um total de 16 machos (verão $n = 7$, outono $n = 4$, inverno $n = 1$ e primavera $n = 4$), o qual apresentou um epitélio com dobras irregulares, caracterizando a ampola do ducto deferente (Figura 19B).

***Chironius flavolineatus*.** Um total de 25 machos maduros (primavera $n = 5$; verão $n = 10$; outono $n = 2$; inverno $n = 8$) foram utilizados para análise da presença de estocagem de espermatozoides. Todos os machos analisados apresentaram estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes (Figura 19C). A ampola do ducto deferente foi observada em cinco machos (inverno $n = 4$ e primavera $n = 1$; Figura 19D).

***Chironius laevicollis*.** Foram examinados um total de 24 machos maduros (primavera $n = 9$; verão $n = 4$; outono $n = 7$; inverno $n = 4$) para análise da presença de estocagem de espermatozoides. Todos os indivíduos analisados apresentaram estocagem, com a presença de espermatozoides no lúmen dos ductos deferentes (Figura 19E). Nesta espécie, também foi observada a ampola do ducto deferente em nove machos (verão $n = 2$, outono $n = 3$, inverno $n = 2$ e primavera $n = 2$; Figura 19F).

Figura 19 – Estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes de machos de *Chironius* (hematoxilina-eosina). A) Ducto deferente de *C. bicarinatus* (junho, 20x); B) Ampola do ducto deferente de *C. bicarinatus* (abril, 40x); C) Ducto deferente de *C. flavolineatus* (janeiro, 40x); D) Ampola do ducto deferente de *C. flavolineatus* (agosto, 40x); E) Ducto deferente de *C. laevicollis* (dezembro, 40x); F) Ampola do ducto deferente de *C. laevicollis* (julho, 40x). L = lúmen; (*) = presença de espermatozoides.



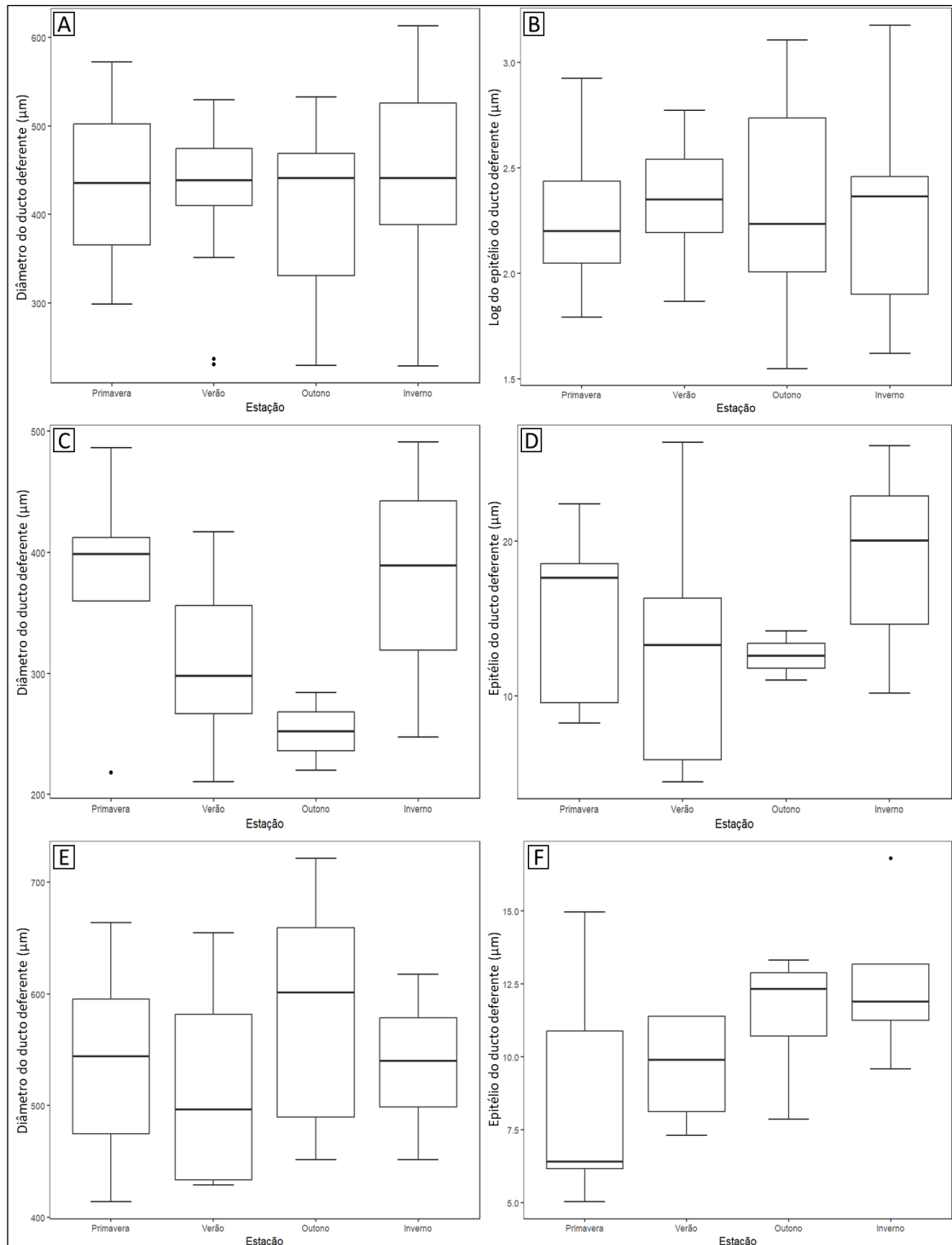
Fonte: Araújo, G. S. 2023

***Chironius bicarinatus*.** Em relação às análises das medidas microscópicas, não foram encontradas diferenças significativas tanto no diâmetro (ANOVA, $F_{(3,71)} = 0,8895$, $p = 0,4509$; Figura 20A), quanto na altura do epitélio do ducto deferente (ANOVA, $F_{(3,71)} = 0,3437$, $p = 0,7938$; Figura 20B) entre as estações do ano.

***Chironius flavolineatus*.** Não foram observadas variações significativas entre as estações do ano no diâmetro (ANOVA, $F_{(3,21)} = 2,2698$, $p = 0,1101$; Figura 20C) e altura do epitélio do ducto deferente (ANOVA, $F_{(3,21)} = 1,557$, $p = 0,2294$; Figura 20D).

***Chironius laevicollis*.** Não foram encontradas diferenças significativas no diâmetro (ANOVA, $F_{(3,20)} = 0,4895$, $p = 0,6935$; Figura 20E) e na altura do epitélio do ducto deferente (ANOVA, $F_{(3,20)} = 2,0398$, $p = 0,1406$; Figura 20F) entre as estações do ano.

Figura 20 – Média e variação do diâmetro e da altura do epitélio do ducto deferente dos machos de *Chironius*. A, B) *C. bicarinatus*; C, D) *C. flavolineatus*; E, F) *C. laevicollis*. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



4.3.4 Sazonalidade do segmento sexual renal (SSR)

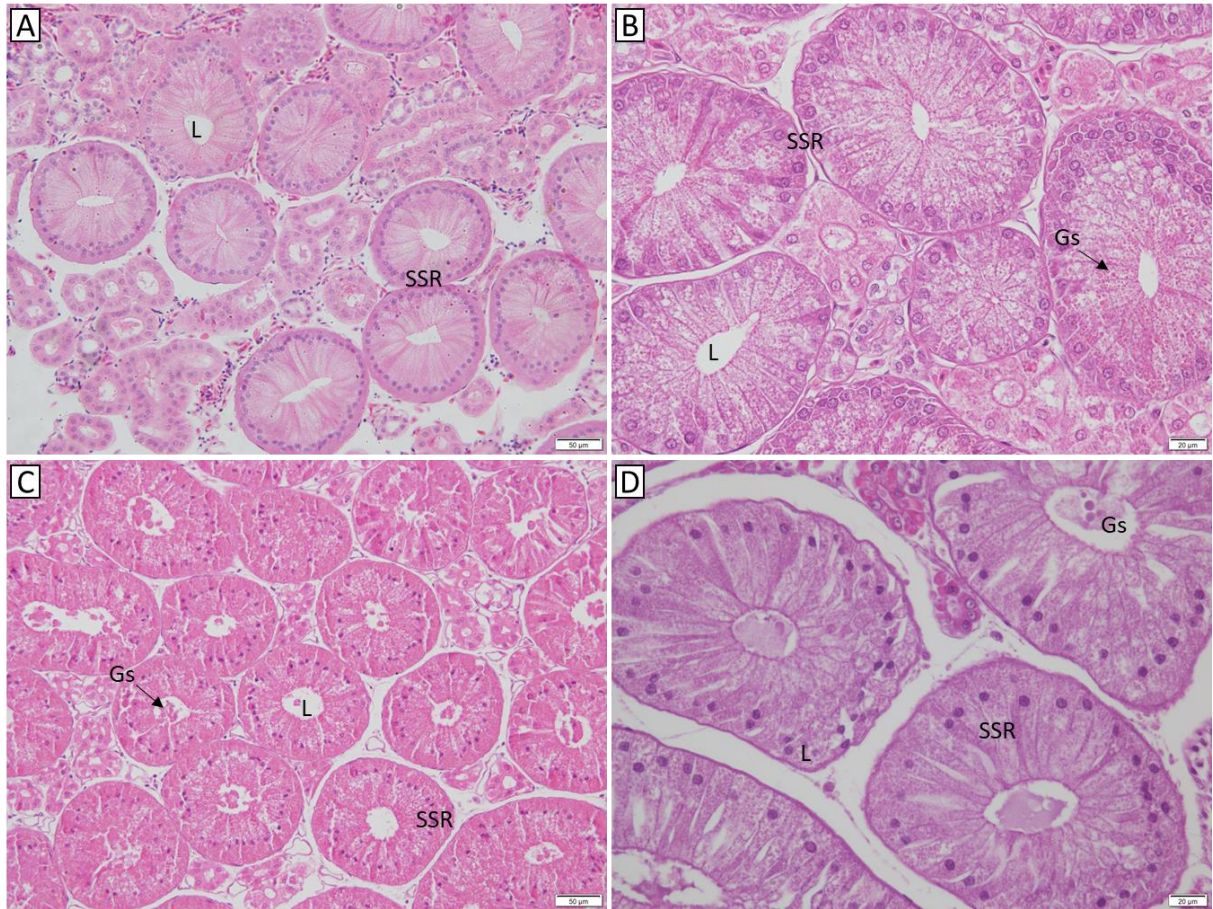
A tabela 7 apresenta todos os exemplares machos de *Chironius* que foram examinados para a classificação do segmento sexual renal de acordo com os estágios da hipertrofia. A figura 21 exemplifica os dois estágios observados para as espécies.

Tabela 7 – Número de exemplares distribuídos de acordo com cada estágio da hipertrofia do segmento sexual renal (SSR). 1 = SSR hipertrofiado com poucos grânulos secretores no citoplasma e nenhum no lúmen, 2 = SSR hipertrofiado com alguns grânulos secretores na região apical das células, 3 = SSR hipertrofiado com muitos grânulos secretores na região apical das células, mas nenhum no lúmen, 4 = SSR hipertrofiado em nível máximo, com muitos grânulos secretores no citoplasma e no lúmen.

Estação	Estágio	Espécie		
		<i>C. bicarinatus</i>	<i>C. flavolineatus</i>	<i>C. laevicollis</i>
Primavera	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	3	$n = 1$	$n = 1$	$n = 1$
	4	$n = 11$	$n = 4$	$n = 5$
Verão	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	3	$n = 8$	$n = 1$	$n = 2$
	4	$n = 6$	$n = 6$	$n = 2$
Outono	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	3	$n = 1$	$n = 0$	$n = 2$
	4	$n = 19$	$n = 2$	$n = 4$
Inverno	1	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	2	$n = 0$	$n = 0$	$n = 0$
	3	$n = 6$	$n = 3$	$n = 0$
	4	$n = 11$	$n = 4$	$n = 3$
Total		63	21	19

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 21 – Ciclo do segmento sexual renal de *Chironius* (hematoxilina-eosina). A) SSR hipertrofiado em estágio 3 – muitos grânulos apenas no citoplasma (*C. bicarinatus*, 20x); B) SSR hipertrofiado em estágio 3 – em maior aumento (*C. flavolineatus*, 40x); C) SSR hipertrofiado em estágio 4 – grânulos no citoplasma e no lúmen (*C. flavolineatus*, 20x); D) SSR hipertrofiado em estágio 4 – em maior aumento (*C. laevicollis*, 40x). SSR = Segmento Sexual Renal; Gs = grânulos secretores; L = lúmen.



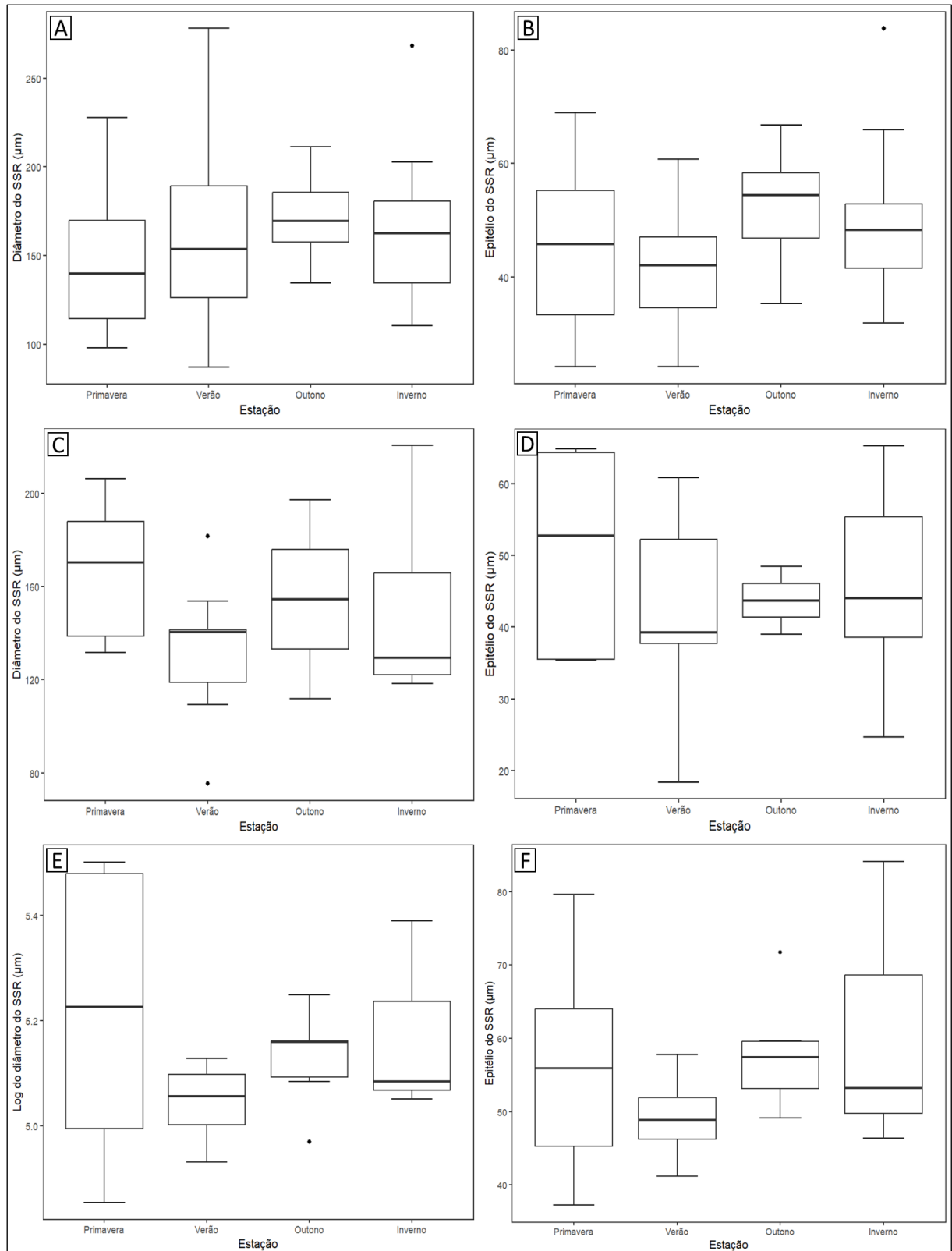
Fonte: Araújo, G. S. 2023

***Chironius bicarinatus*.** Nas análises das medidas microscópicas não foi observada nenhuma diferença significativa no diâmetro do SSR (Kruskal-Wallis, $X^2_{(3)} = 4,5626$, $p = 0,2068$; Figura 22A) entre as estações. Já na altura do epitélio do SSR foi encontrada uma diferença significativa (ANOVA, $F_{(3,73)} = 3,7843$, $p = 0,0139$; Figura 22B), no qual o teste a posteriori de Tukey revelou que a variação está entre a amostra do outono e do verão (Tukey, Outono-Verão, $p = 0,0102$).

***Chironius flavolineatus*.** Não foram encontradas variações significativas no diâmetro do SSR (ANOVA, $F_{(3,21)} = 1,1694$, $p = 0,345$; Figura 22C) e na altura do epitélio do SSR (ANOVA, $F_{(3,21)} = 0,4702$, $p = 0,7063$; Figura 22D) entre as estações do ano.

***Chironius laevicollis*.** Não foram observadas diferenças significativas entre as estações, tanto para o diâmetro do SSR (ANOVA, $F_{(3,19)} = 1,1135$, $p = 0,3683$; Figura 22E) quanto para a altura do epitélio do SSR (ANOVA, $F_{(3,19)} = 0,6647$, $p = 0,584$; Figura 22F).

Figura 22 – Média e variação do diâmetro e da altura do epitélio do SSR dos machos de *Chironius*. A, B) *C. bicarinatus*; C, D) *C. flavolineatus*; E, F) *C. laevicollis*. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



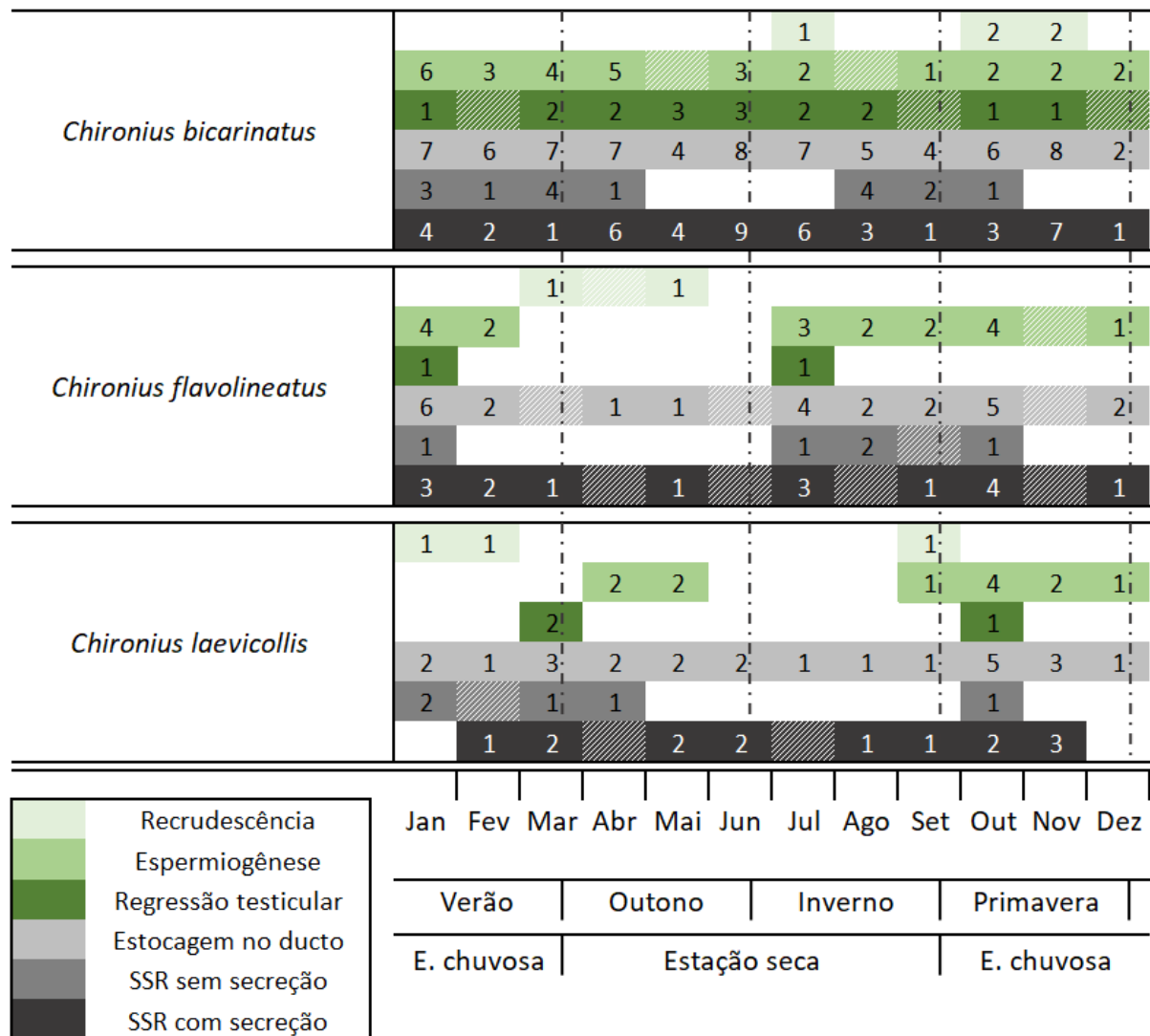
Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.3.5 Resumo dos ciclos reprodutivos dos machos

Nas três espécies, não foram observados machos em estágio de quiescência testicular (Figura 23). Em *C. bicarinatus*, o diâmetro e a altura do epitélio seminífero dos machos coletados na primavera foram maiores do que os machos coletados nas demais estações. Em *C. flavolineatus*, a recrudescência é observada apenas no outono e em *C. laevicollis* este evento surge em dois momentos, no verão e no inverno (início de setembro) (Figura 23). Em ambas as espécies, não foi observada variação significativa nas medidas microscópicas do túbulo seminífero. A espermiogênese estendida foi observada nas três espécies (Figura 23). Embora este estágio tenha sido encontrado ao longo de todo o ano em *C. bicarinatus*, há um maior número de indivíduos concentrados no verão (Figura 23). O estágio de regressão em *C. bicarinatus* foi observado ao longo de todos os meses do ano, entretanto apresentou um maior número de indivíduos concentrado no outono. Em *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, a regressão testicular surge em dois momentos distintos, verão/inverno e outono/primavera, respectivamente (Figura 23).

Nas três espécies aqui estudadas não foi observada variação sazonal no diâmetro e altura do epitélio do ducto deferente ao longo das estações do ano. O segmento sexual renal foi observado em nível máximo de hipertrofia em todas as estações do ano para todas as espécies (Figura 23). Em *C. bicarinatus*, a altura do epitélio do SSR dos machos coletados no outono foi maior do que os machos coletados no verão. Em *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, não foram encontradas diferenças significativas nas medidas microscópicas do SSR.

Figura 23 – Resumo dos eventos do ciclo reprodutivo dos machos de *Chironius*. Os números dentro das caixas indicam a amostra observada para cada fase do ciclo reprodutivo. As células hachuradas representam inferências. SSR = segmento sexual renal.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.4 Caracterização dos ciclos reprodutivos das fêmeas

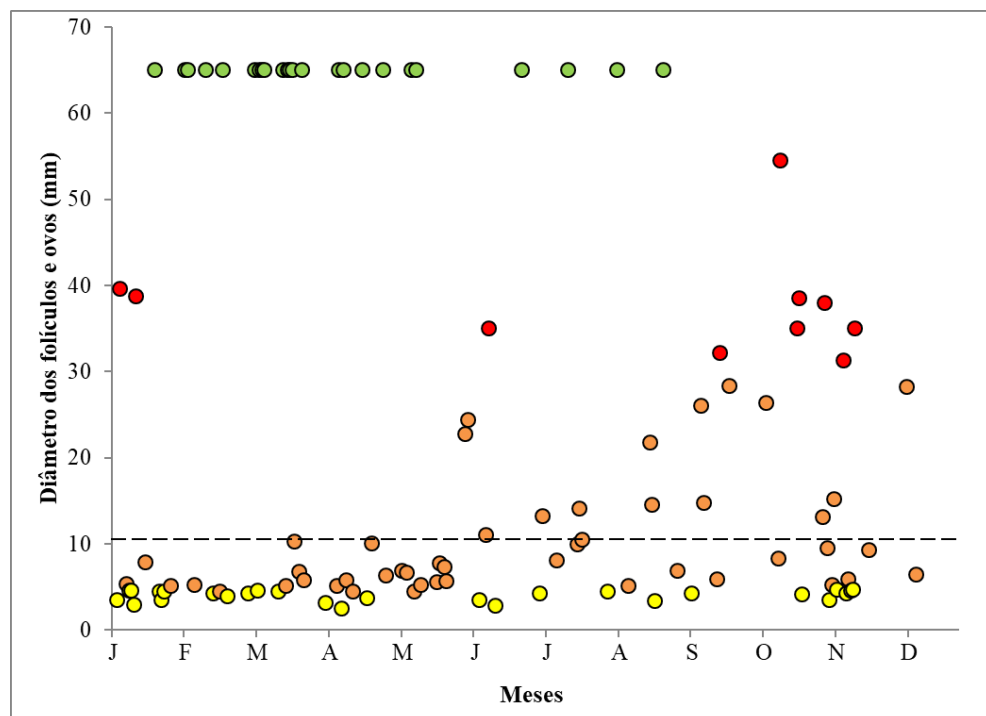
4.4.1 Sazonalidade da vitelogênese, prenhez e nascimento de filhotes

***Chironius bicarinatus*.** Um total de 77 fêmeas sexualmente maduras foram analisadas para delineamento do ciclo reprodutivo (Figura 24). Folículos pré-vitelogênicos (V1) foram observados ao longo de praticamente todos os meses do ano, com exceção dos meses de maio e dezembro. Folículos com deposição de vitelo (V2) foram observados em todos os meses do ano ($n = 48$ fêmeas). Entretanto, folículos em fase inicial da vitelogênese (< 10 mm, $n = 31$) foram observados em todas as estações do ano. Folículos em vitelogênese intermediária (≥ 10

mm, $n = 10$) e avançada (≥ 20 mm, $n = 7$) foram encontrados entre o final de março até dezembro e a quantidade variou de 3 a 13. Um total de dez fêmeas ovígeras foram analisadas e continham de 2 a 11 ovos nos ovidutos (maiores ovos entre 31,33 e 54,48 mm). A fêmea que continha apenas 2 ovos, alocados somente no lado esquerdo, possuía 840 mm de CRC e os ovos mediam 54,48 e 53,4 mm de comprimento. Além disso, foram observados três folículos no início da vitelogênese apenas no ovário esquerdo (maior folículo 8,31 mm). A fêmea que continha 11 ovos, cinco no oviduto direito e seis no oviduto esquerdo, possuía 820 mm de CRC e os ovos mediam entre 21,09 e 31,33 mm de comprimento. Assim como a fêmea anterior, esta fêmea apresentou sete folículos no início da vitelogênese (maior folículo 5,93), apenas no ovário esquerdo.

Da amostra total analisada para esta espécie, um total de 24 indivíduos foram considerados filhotes recém-nascidos de acordo com o CRC observado (entre 212 e 304 mm) e foram coletados durante o verão ($n = 15$), outono ($n = 5$) e inverno ($n = 4$).

Figura 24 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de *C. bicarinatus*. Círculo amarelo = pré-vitelogênese; Círculo laranja = vitelogênese; Círculo vermelho = prenhez; Círculo verde = recém-nascidos; A linha tracejada indica a média do tamanho dos folículos vitelogênicos.



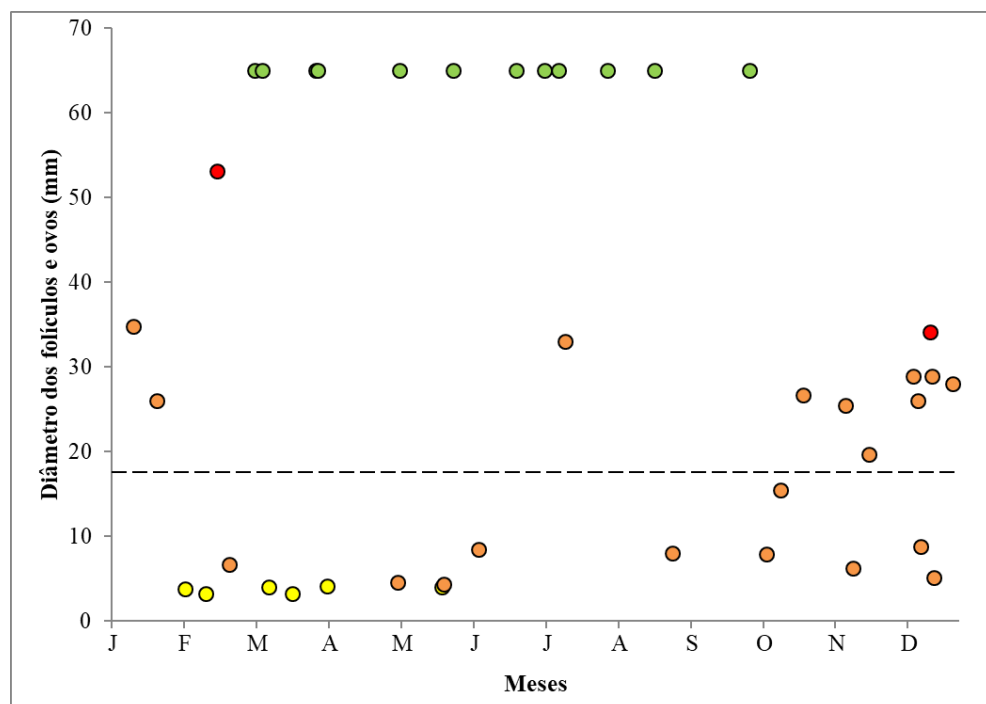
Fonte: Araújo, G. S. 2023

***Chironius flavolineatus*.** Um total de 26 fêmeas sexualmente maduras foram analisadas para delineamento do ciclo reprodutivo (Figura 25). Folículos pré-vitelogênicos foram

observados de janeiro a maio ($n = 6$). Folículos com deposição de vitelo foram observados praticamente ao longo de todos os meses do ano ($n = 20$ fêmeas), com exceção de março, abril e setembro. Entretanto, folículos em fase inicial da vitelogênese (< 10 mm, $n = 9$) foram observados pontualmente em todas as estações do ano. Folículos em vitelogênese intermediária (≥ 10 mm, $n = 2$) e avançada (≥ 20 mm, $n = 9$) foram encontrados entre o outubro e janeiro, e pontualmente em julho, e a quantidade variou de 3 a 7. Apenas duas fêmeas ovígeras foram coletadas e ambas possuíam folículos em fase inicial da vitelogênese (5,08 e 6,61 mm). Uma das fêmeas possuía 714 mm de CRC, continha 3 ovos apenas no oviduto esquerdo os quais variaram de 19,91 a 34,06 mm de comprimento. A outra fêmea prenhe possuía 710 mm de CRC, continha 4 ovos, três no oviduto direito e 1 no oviduto esquerdo, os quais variaram de 44,25 a 53,07 mm de comprimento.

Da amostra total analisada para a espécie, um total de 14 indivíduos foram considerados filhotes recém-nascidos de acordo com o CRC observado (entre 199 e 307 mm) e foram coletados durante todas as estações do ano: primavera ($n = 1$), verão ($n = 2$), outono ($n = 5$) e inverno ($n = 4$). Dois dos filhotes não possuíam a data de coleta correta, portanto não foram adicionados ao gráfico.

Figura 25 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de *C. flavolineatus*. Círculo amarelo = pré-vitelogênese; Círculo laranja = vitelogênese; Círculo vermelho = prenhez; Círculo verde = recém-nascidos; A linha tracejada indica a média do tamanho dos folículos vitelogênicos.

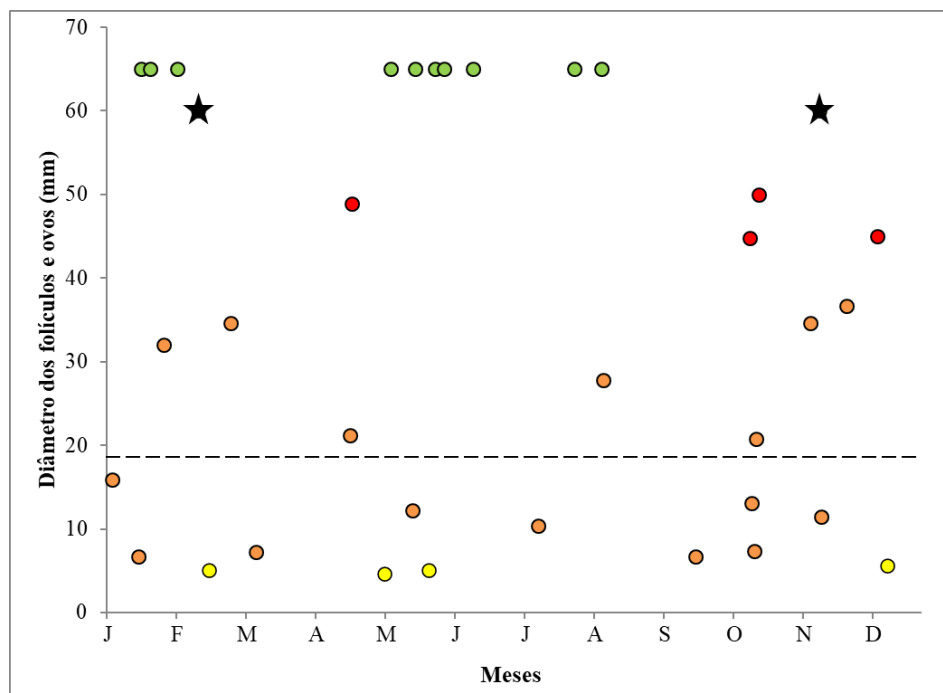


Fonte: Araújo, G. S. 2023

***Chironius laevicollis*.** Um total de 21 fêmeas sexualmente maduras foram analisadas para delineamento do ciclo reprodutivo (Figura 26). Folículos pré-vitelogênicos foram observados em fevereiro, maio e dezembro ($n = 4$). Folículos com deposição de vitelo foram observados em todas as estações do ano ($n = 16$ fêmeas). Entretanto, folículos em fase inicial da vitelogênese (< 10 mm, $n = 4$) foram observados em janeiro, março, setembro e outubro. Folículos em vitelogênese intermediária (≥ 10 mm, $n = 5$) e avançada (≥ 20 mm, $n = 7$) foram encontrados em praticamente todos os meses do ano, com exceção de março, junho, setembro e dezembro, e a quantidade variou de 1 a 22. Quatro fêmeas ovígeras foram coletadas, entretanto, uma delas havia sido atropelada e não foi possível contar e medir os ovos. O CRC das três fêmeas prenhes analisadas variou de 1290 a 1454 mm e os ovos mediam entre 29,08 e 49,89 mm de comprimento. As três fêmeas estavam em vitelogênese, uma em fase inicial (maior folículo 7,25) e duas em fase intermediária/avançada (maiores folículos 12,98 e 21,2 mm). Outras duas fêmeas pós-parto foram coletadas em novembro e fevereiro, com o CRC de 1350 e 1390 mm. Ambas fêmeas haviam feito desova de 9 e 15 ovos respectivamente.

Da amostra total analisada para a espécie, um total de 10 indivíduos foram considerados filhotes recém-nascidos de acordo com o CRC observado (entre 222 e 328 mm) e foram coletados durante o verão ($n = 3$), outono ($n = 5$) e inverno ($n = 2$).

Figura 26 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de *C. laevicollis*. Círculo amarelo = pré-vitelogênese; Círculo laranja = vitelogênese; Círculo vermelho = prenhez; Círculo verde = recém-nascidos; Estrela = postura de ovos; A linha tracejada indica a média do tamanho dos folículos vitelogênicos.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.4.2 Frequência reprodutiva e tamanho da ninhada

A proporção de fêmeas reprodutivas variou de 71,43% em *C. bicarinatus* a 76,92% em *C. flavolineatus* (Tabela 8), indicando uma reprodução anual para as três espécies. Além disso, fêmeas das três espécies (*C. bicarinatus*, $n = 3$; *C. flavolineatus*, $n = 2$; *C. laevicollis*, $n = 3$) continham ovos nos ovidutos e folículos vitelogênicos simultaneamente, indicando potencial para produção de múltiplas ninhadas. Seis fêmeas continham folículos em fase inicial da vitelogênese (maiores folículos entre 5,08 e 8,31 mm) e duas fêmeas de *C. laevicollis* continham folículos em vitelogênese intermediária/avançada (12,98 e 21,2 mm).

Tabela 8 – Frequência reprodutiva nas espécies de *Chironius* estudadas.

Espécie	Total de fêmeas reprodutivas	Total de fêmeas adultas	Proporção de fêmeas reprodutivas (%)	Tamanho da ninhada (V2)	Tamanho da ninhada (ovos)
<i>C. bicarinatus</i>	55	77	71,43%	$8,5 \pm 2,98$ (3–15)	$7,7 \pm 2,86$ (2–11)
<i>C. flavolineatus</i>	20	26	76,92%	$5,33 \pm 1,15$ (3–7)	$3,5 \pm 0,71$ (3–4)
<i>C. laevicollis</i>	16	21	76,19%	$10,77 \pm 7,03$ (1–22)	$13,2 \pm 3,03$ (9–17)

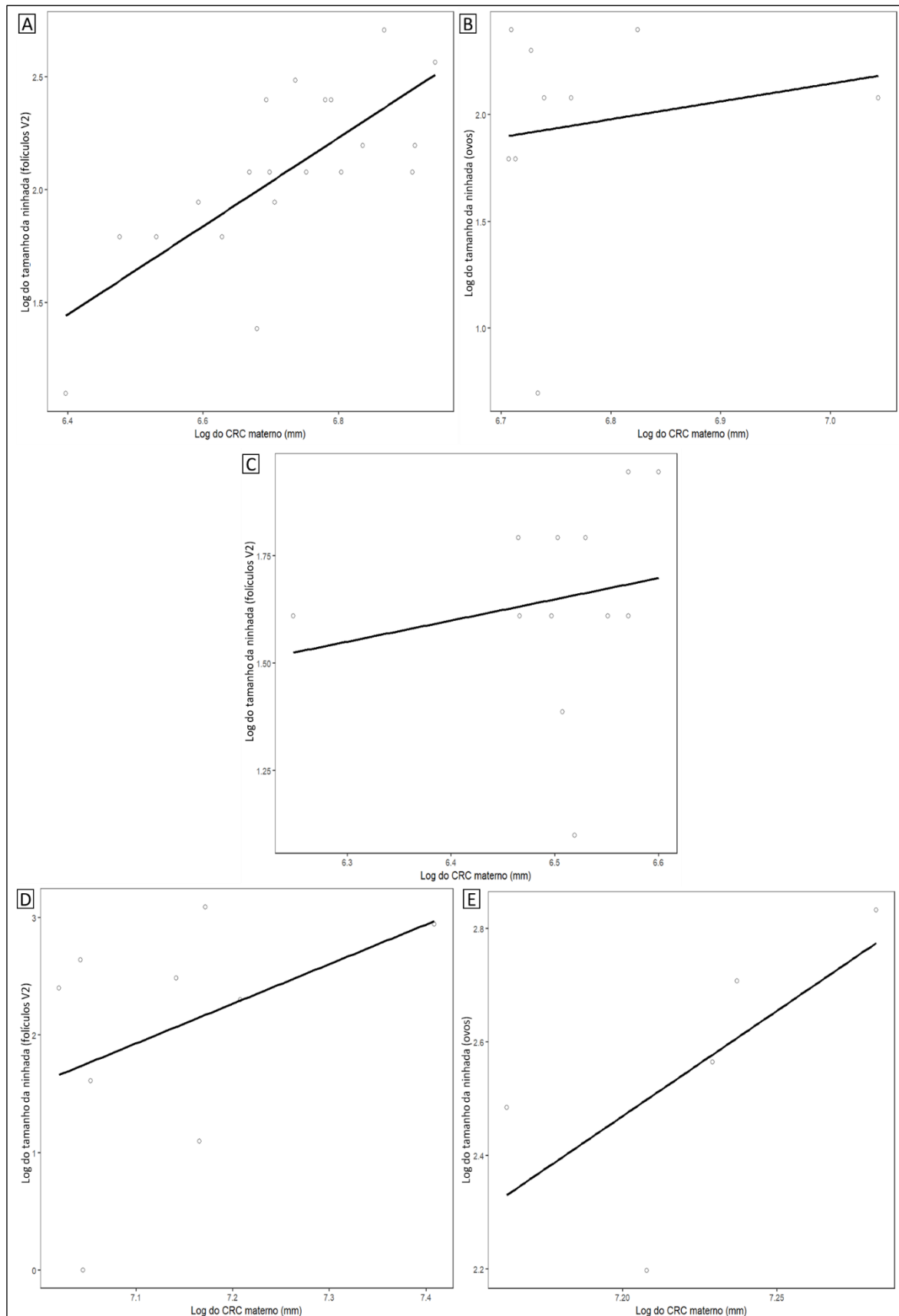
Fonte: Araújo, G. S. 2023

***Chironius bicarinatus*.** Não foi observado diferença significativa entre o número de folículos e o número de ovos (ANCOVA, $F_{(1,25)} = 0,6242$, $p = 0,4369$). O tamanho médio da ninhada considerando os folículos vitelogênicos foi de $8,5 \pm 2,98$ (3–15) e foi positiva e significativamente correlacionado com o tamanho do corpo materno ($r^2 = 0,542$, $p = 0,0002$; Figura 27A). Já o tamanho médio da ninhada considerando os ovos foi de $7,7 \pm 2,86$ (2–11) e não foi positivamente correlacionado com o tamanho do corpo materno ($r^2 = 0,029$, $p = 0,658$; Figura 27B).

***Chironius flavolineatus*.** Não foi encontrada variação significativa entre o número de folículos e ovos (ANCOVA, $F_{(1,10)} = 4,7817$, $p = 0,0536$). O tamanho médio da ninhada considerando os folículos vitelogênicos de *C. flavolineatus* foi de $5,33 \pm 1,15$ (3–7) e não foi significativamente correlacionado com o tamanho do corpo materno ($r^2 = 0,035$, $p = 0,557$; Figura 27C). Já o tamanho médio da ninhada considerando os ovos foi de $3,5 \pm 0,71$ (3–4) e não foi possível realizar esta análise devido a amostragem de fêmeas ovígeras.

***Chironius laevicollis*.** Também não foi encontrada diferença significativa entre o número de folículos e ovos (ANCOVA, $F_{(1,8)} = 0,8742$, $p = 0,3771$). O tamanho médio da ninhada considerando os folículos vitelogênicos de *C. laevicollis* foi de $10,77 \pm 7,03$ (1–22) e não foi significativamente correlacionado com o tamanho do corpo materno ($r^2 = 0,170$, $p = 0,268$; Figura 27D). Já o tamanho médio da ninhada considerando os ovos foi de $13,2 \pm 3,03$ (9–17) e também não foi positivamente correlacionado com o tamanho do corpo materno ($r^2 = 0,4494$, $p = 0,2156$; Figura 27E).

Figura 27 – Correlação entre o comprimento rostro-cloacal das fêmeas reprodutivas e o tamanho da ninhada em *Chironius*. A, B) *C. bicarinatus*; C) *C. flavolineatus*; D, E) *C. laevicollis*.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.4.3 Variação sazonal do infundíbulo posterior

***Chironius bicarinatus*.** Foi observada variação significativa na altura do epitélio infundibular entre as estações do ano (ANOVA, $F_{(3,68)} = 6,6143$, $p = 0,0005$; Tabela 9; Figura 29A). O teste a posteriori de Tukey revelou que existe diferença significativa entre as medidas microscópicas de três estações: verão e inverno (Tukey, Verão-Inverno, $p = 0,0183$), verão e outono (Tukey, Verão-Outono, $p = 0,0003$) e verão e primavera (Tukey, Verão-Primavera, $p = 0,0284$), onde o verão apresentou menores médias (Figura 29A) e consequentemente menores tamanhos (Figura 28A). Também foi observada diferença significativa na altura do epitélio infundibular em relação ao estágio reprodutivo ($t_{(67)} = -2,0897$, $p = 0,0404$; Tabela 9, Figura 29B), onde fêmeas vitelogênicas (V2) apresentam médias maiores que fêmeas pré-vitelogênicas (V1) (Tabela 9).

***Chironius flavolineatus*.** Não foi encontrada diferença significativa na altura do epitélio infundibular (Figura 28C) entre as estações do ano (ANOVA, $F_{(3,21)} = 0,445$, $p = 0,7234$; Tabela 9, Figura 29C) e nem entre os estágios reprodutivos ($t_{(23)} = -1,0575$, $p = 0,3013$; Tabela 9, Figura 29D).

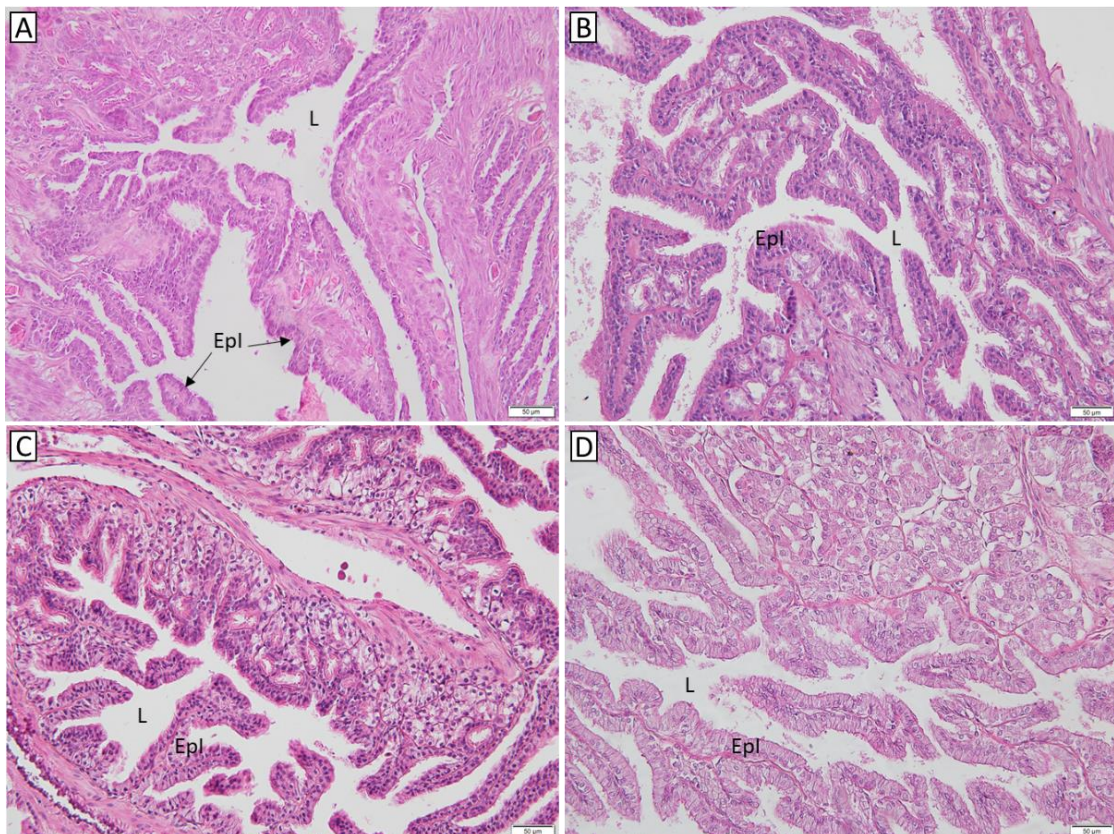
***Chironius laevicollis*.** Foi encontrada uma variação significativa na altura do epitélio do infundíbulo posterior (Figura 28D) entre as estações (ANOVA, $F_{(3,16)} = 4,2068$, $p = 0,02256$; Figura 29E), no qual o teste a posteriori de Tukey revelou que a diferença está entre as médias da primavera e o inverno (Tukey, Primavera-Inverno, $p = 0,0284$; Tabela 9). Por outro lado, não foi observada diferença significativa na altura do epitélio infundibular em relação ao estágio reprodutivo ($t_{(18)} = -1,1174$, $p = 0,2785$; Tabela 9, Figura 29F).

Tabela 9 – Médias $\pm$ erro padrão, valores mínimo e máximo e n amostral da altura do epitélio do infundíbulo posterior das fêmeas de *Chionius*. V1 = folículo pré-vitelogênico, V2 = folículo vitelogênico.

Espécie	Estação				Estágio reprodutivo	
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	V1	V2
<i>C. bicarinatus</i>	16,61 $\pm$ 3,27 (11,73 - 23,64) $n=18$	13,8 $\pm$ 3,07 (7,8 - 20,65) $n=19$	18,01 $\pm$ 2,8 (13,16 - 23,18) $n=18$	16,82 $\pm$ 2,77 (11,56 - 20,95) $n=17$	15,23 $\pm$ 3,7 (7,8 - 23,18) $n=24$	16,94 $\pm$ 2,94 (11,49 - 23,64) $n=45$
<i>C. flavolineatus</i>	16,27 $\pm$ 3,79 (8,96 - 22,17) $n=11$	15,98 $\pm$ 5,14 (7,89 - 22,55) $n=6$	14,37 $\pm$ 1,96 (11,41 - 16,57) $n=5$	14,16 $\pm$ 2,69 (11,23 - 22,17) $n=3$	14,01 $\pm$ 1,94 (11,42 - 16,53) $n=5$	15,96 $\pm$ 3,94 (7,89 - 22,55) $n=20$
<i>C. laevicollis</i>	17,19 $\pm$ 4,16 (12,33 - 23,11) $n=7$	12,81 $\pm$ 1,79 (9,45 - 14,51) $n=6$	13,88 $\pm$ 2,21 (11,11 - 16,41) $n=4$	11,18 $\pm$ 0,28 (10,87 - 11,42) $n=3$	12,56 $\pm$ 1,09 (11,11 - 13,43) $n=4$	14,75 $\pm$ 3,8 (9,45 - 23,11) $n=16$

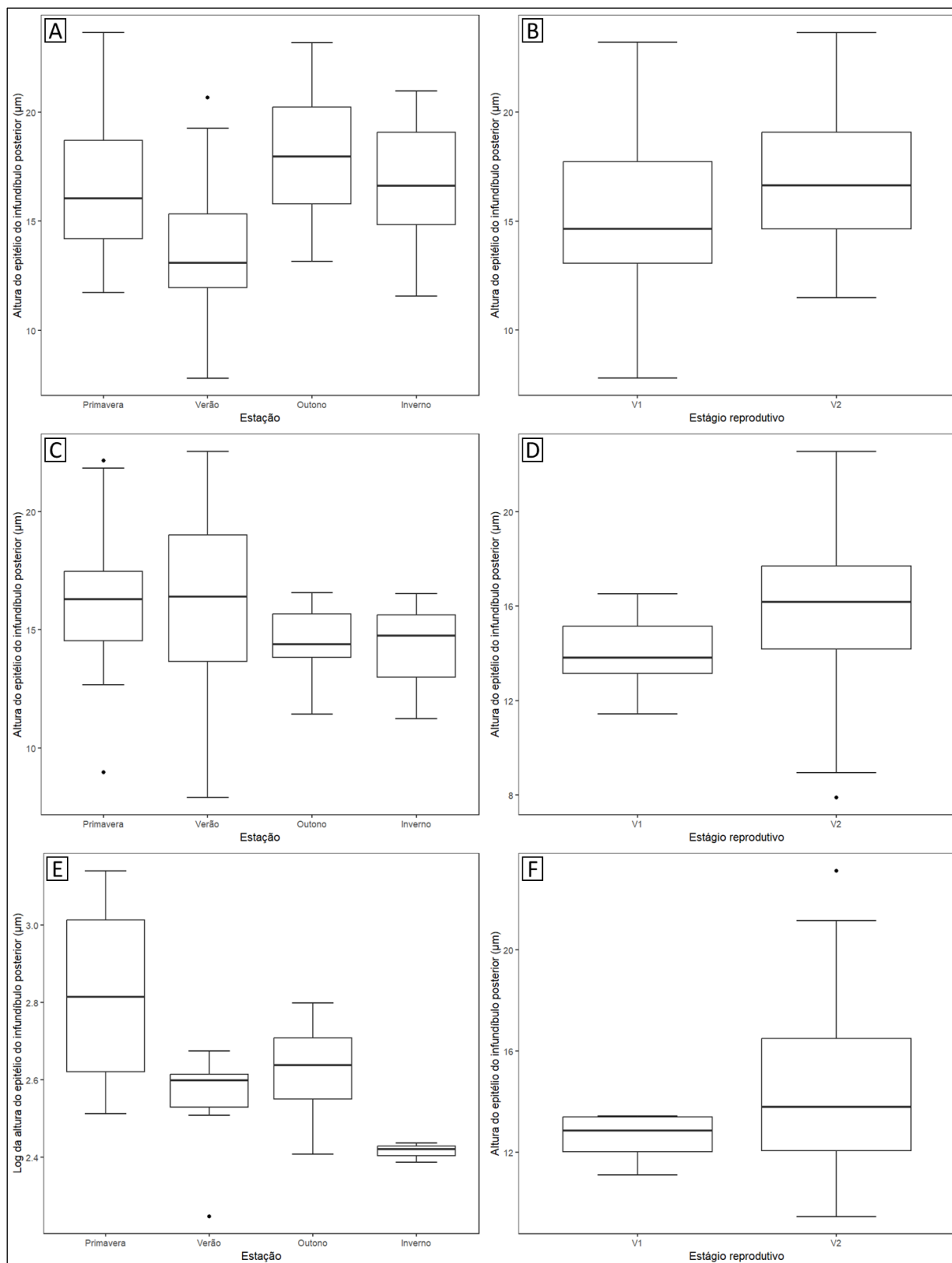
Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 28 – Infundíbulo posterior das fêmeas de *Chironius* (hematoxilina-eosina). A, B) *C. bicarinatus* (verão e outono, respectivamente, 20x); C) *C. flavolineatus* (primavera, 20x); D) *C. laevicollis* (primavera, 20x). Epl = epitélio infundibular, L = lúmen.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 29 – Variação da altura do epitélio infundibular (μm) considerando as estações do ano e o estágio reprodutivo das fêmeas. A, B) *C. bicarinatus*; C, D) *C. flavolineatus*; E, F) *C. laevicollis*. V1 = folículos pré-vitelogênicos, V2 = folículos vitelogênicos.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.4.4 Variação sazonal do útero glandular

***Chironius bicarinatus*.** Foi observada variação significativa na altura do epitélio uterino (Figura 30A, B) entre as estações do ano (Kruskal-Wallis, $X^2_{(3)} = 20,826$, $p = 0,0001$; Figura 31A). O teste a posteriori de Tukey revelou que existe diferença significativa entre as medidas microscópicas de três estações: verão e inverno (Tukey, Verão-Inverno, $p = 0,0009$), verão e outono (Tukey, Verão-Outono, $p = 0,0084$) e verão e primavera (Tukey, Verão-Primavera, $p = 0,0007$). Também foi observado uma diferença significativa na altura do epitélio uterino em relação ao estágio reprodutivo ($t_{(65)} = -2,2844$, $p = 0,02562$; Figura 31B), onde fêmeas vitelogênicas (V2) apresentam médias maiores que fêmeas pré-vitelogênicas (Tabela 10).

No diâmetro das glândulas uterinas, foi observada variação significativa entre as estações do ano (ANOVA, $F_{(3,68)} = 11,078$, $p < 0,0001$; Figura 30A, B; 32A), onde o teste de Tukey mostrou que as diferenças estão entre as seguintes estações: verão e inverno (Tukey, Verão-Inverno, $p < 0,0001$), verão e outono (Tukey, Verão-Outono, $p < 0,0001$) e verão e primavera (Tukey, Verão-Primavera, $p = 0,0006$). Também foi observada diferença significativa no diâmetro das glândulas uterinas em relação ao estágio reprodutivo ($t_{(67)} = -3,6716$, $p = 0,0004$; Figura 32B), onde fêmeas vitelogênicas (V2) apresentam médias maiores que fêmeas pré-vitelogênicas (V1) (Tabela 10).

***Chironius flavolineatus*.** Não foi encontrada diferença significativa na altura do epitélio uterino entre as estações do ano (ANOVA, $F_{(3,20)} = 0,3393$, $p = 0,7971$; Tabela 10, Figura 30C; 31C) e entre os estágios reprodutivos ($t_{(22)} = -0,94731$, $p = 0,3538$; Tabela 10, Figura 31D).

Em relação a variação no diâmetro das glândulas uterinas, não foi encontrada diferença significativa entre as estações do ano (ANOVA, $F_{(3,20)} = 0,9652$, $p = 0,4285$; Tabela 10, Figura 30C; 32C). Já analisando a variação do diâmetro das glândulas de acordo com o estágio reprodutivo, foi observada uma variação significativa ($t_{(22)} = -3,8553$, $p = 0,0008$; Tabela 10, Figura 32D), onde as médias das fêmeas vitelogênicas (V2) foram maiores que as fêmeas não-vitelogênicas (V1) (Tabela 10).

***Chironius laevicollis*.** Não foi encontrada variação significativa na altura do epitélio do uterino entre as estações do ano (ANOVA, $F_{(3,12)} = 1,2914$, $p = 0,3221$; Tabela 10, Figura 30D; 31E) e entre os estágios reprodutivos ($t_{(14)} = -1,2607$, $p = 0,228$; Tabela 10, Figura 31F).

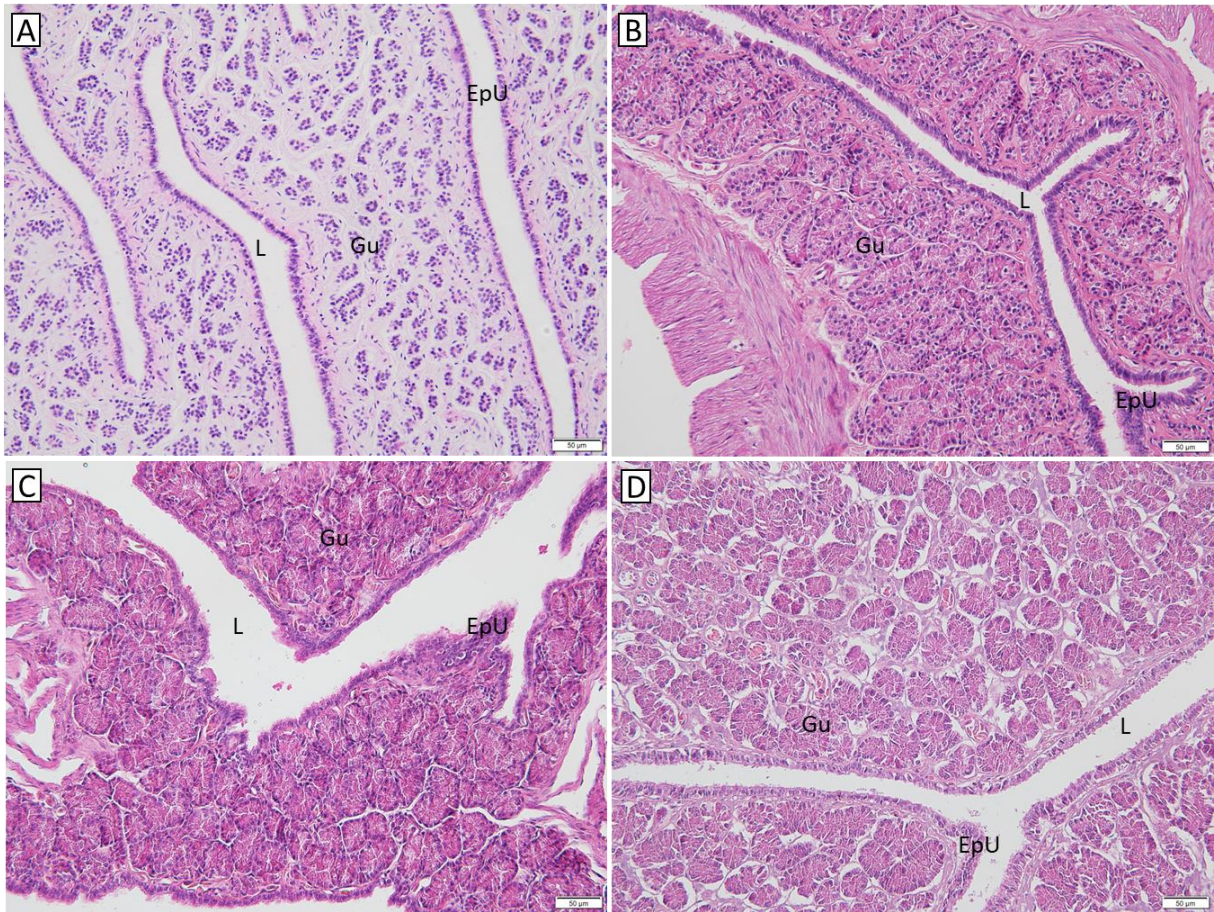
No diâmetro das glândulas uterinas, também não foi observada diferença significativa na altura do epitélio uterino entre as estações (ANOVA, $F_{(3,12)} = 1,9744$, $p = 0,1717$; Tabela 10, Figura 32E) e entre os estágios reprodutivos ($t_{(14)} = -1,3287$, $p = 0,2052$; Tabela 10, Figura 32F).

Tabela 10 – Médias $\pm$ erro padrão, valores mínimo e máximo e n amostral das medidas microscópicas do útero glandular das fêmeas de *Chironius*. AEU = altura do epitélio uterino, DGU = diâmetro das glândulas uterinas, V1 = folículo pré-vitelogênico, V2 = folículo vitelogênico.

Espécie	Variável	Estação				Estágio reprodutivo	
		Primavera	Verão	Outono	Inverno	V1	V2
<i>C. bicarinatus</i>	AEU	17,38 $\pm$ 4,73 (10,71 - 24,28) $n=14$	11,93 $\pm$ 5,06 (8,04 - 30,34) $n=19$	15,19 $\pm$ 2,86 (10,21 - 20,08) $n=20$	16,41 $\pm$ 2,81 (13,17 - 22,71) $n=16$	13,78 $\pm$ 5,31 (8,04 - 20,34) $n=23$	15,64 $\pm$ 3,53 (8,28 - 24,28) $n=44$
	DGU	45,88 $\pm$ 19,44 (26,11 - 85,2) $n=15$	28,27 $\pm$ 10,56 (13,83 - 52,18) $n=19$	45,42 $\pm$ 9,77 (19,49 - 59,89) $n=21$	48,56 $\pm$ 15,14 (20,45 - 87,3) $n=17$	33,78 $\pm$ 15,72 (13,83 - 85,2) $n=23$	45,28 $\pm$ 13,09 (17,39 - 78,76) $n=46$
<i>C. flavolineatus</i>	AEU	15,75 $\pm$ 4,92 (8,35 - 25,67) $n=10$	15,41 $\pm$ 4,82 (7,81 - 21,71) $n=7$	16,76 $\pm$ 3,85 (11,48 - 20,72) $n=4$	13,23 $\pm$ 4,34 (8,22 - 15,83) $n=3$	14 $\pm$ 3,76 (7,81 - 17,48) $n=6$	16,01 $\pm$ 4,68 (8,22 - 25,67) $n=18$
	DGU	56,77 $\pm$ 19,11 (13,3 - 76,53) $n=10$	51,7 $\pm$ 28,77 (18,3 - 90,89) $n=7$	39,36 $\pm$ 18,35 (26,21 - 65,91) $n=4$	37,37 $\pm$ 15,32 (24,84 - 54,5) $n=3$	26,26 $\pm$ 6,58 (18,3 - 37,27) $n=6$	57,86 $\pm$ 19,45 (13,3 - 90,89) $n=18$
<i>C. laevicollis</i>	AEU	20,2 $\pm$ 3,24 (15,81 - 23,13) $n=4$	16,93 $\pm$ 7,3 (11,3 - 29,79) $n=6$	17,59 $\pm$ 5,74 (12,46 - 23,79) $n=3$	11,82 $\pm$ 2,76 (9,99 - 14,99) $n=3$	13,19 $\pm$ 2,34 (11,3 - 15,81) $n=3$	17,77 $\pm$ 6,05 (9,99 - 29,79) $n=13$
	DGU	49,66 $\pm$ 19,1 (25,58 - 65,99) $n=4$	33,56 $\pm$ 12,59 (14,97 - 49) $n=6$	53,93 $\pm$ 4,8 (48,54 - 57,76) $n=3$	43,79 $\pm$ 10,85 (31,65 - 52,59) $n=3$	33,41 $\pm$ 13,11 (25,58 - 48,54) $n=3$	45,61 $\pm$ 14,53 (14,97 - 65,99) $n=13$

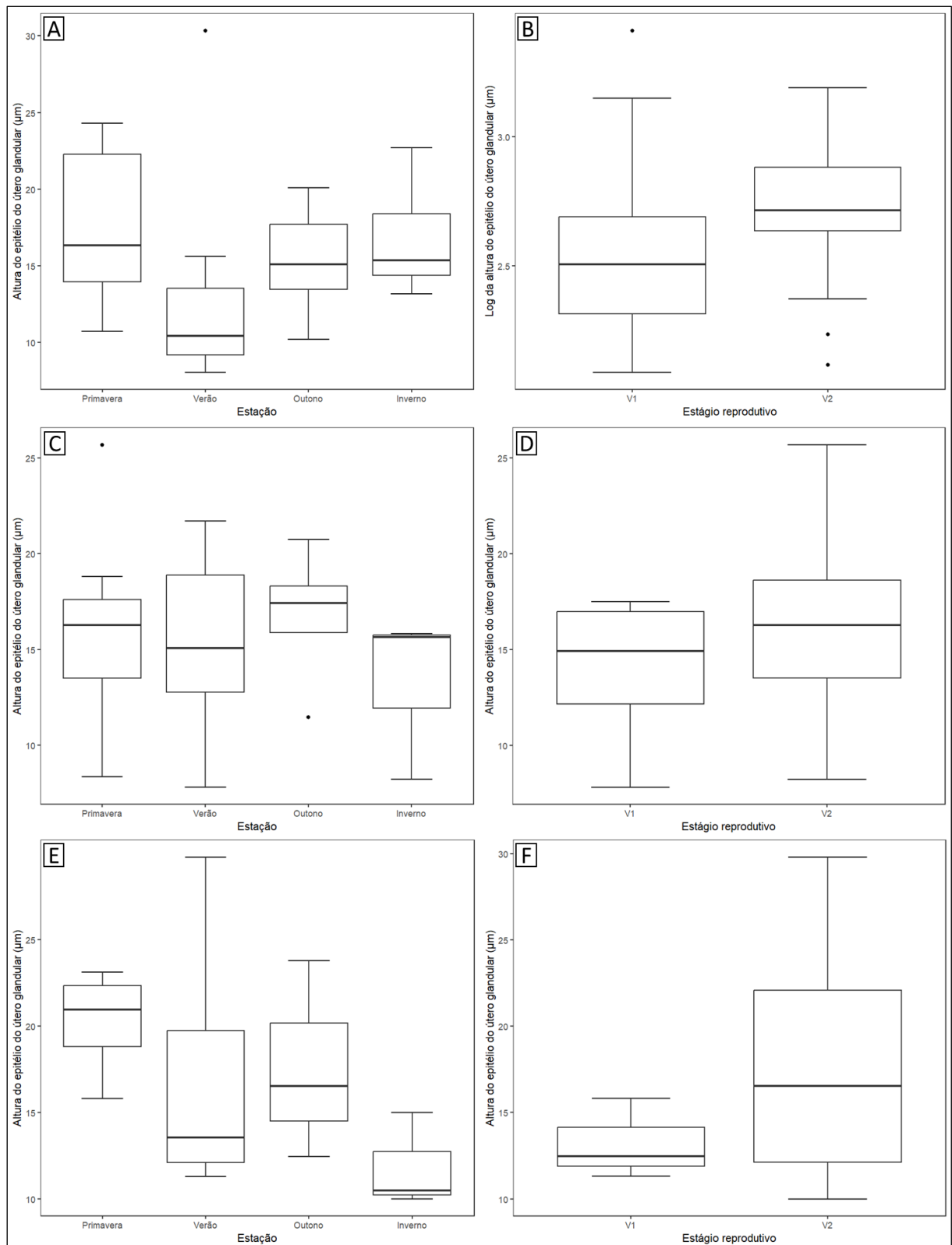
Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 30 – Útero glandular das fêmeas de *Chironius* (hematoxilina-eosina). A, B) *C. bicarinatus* (verão e outono, respectivamente, 20x); C) *C. flavolineatus* (inverno, 20x); D) *C. laevicollis* (outono, 20x). EpU = epitélio uterino, Gu = glândulas uterinas, L = lúmen.



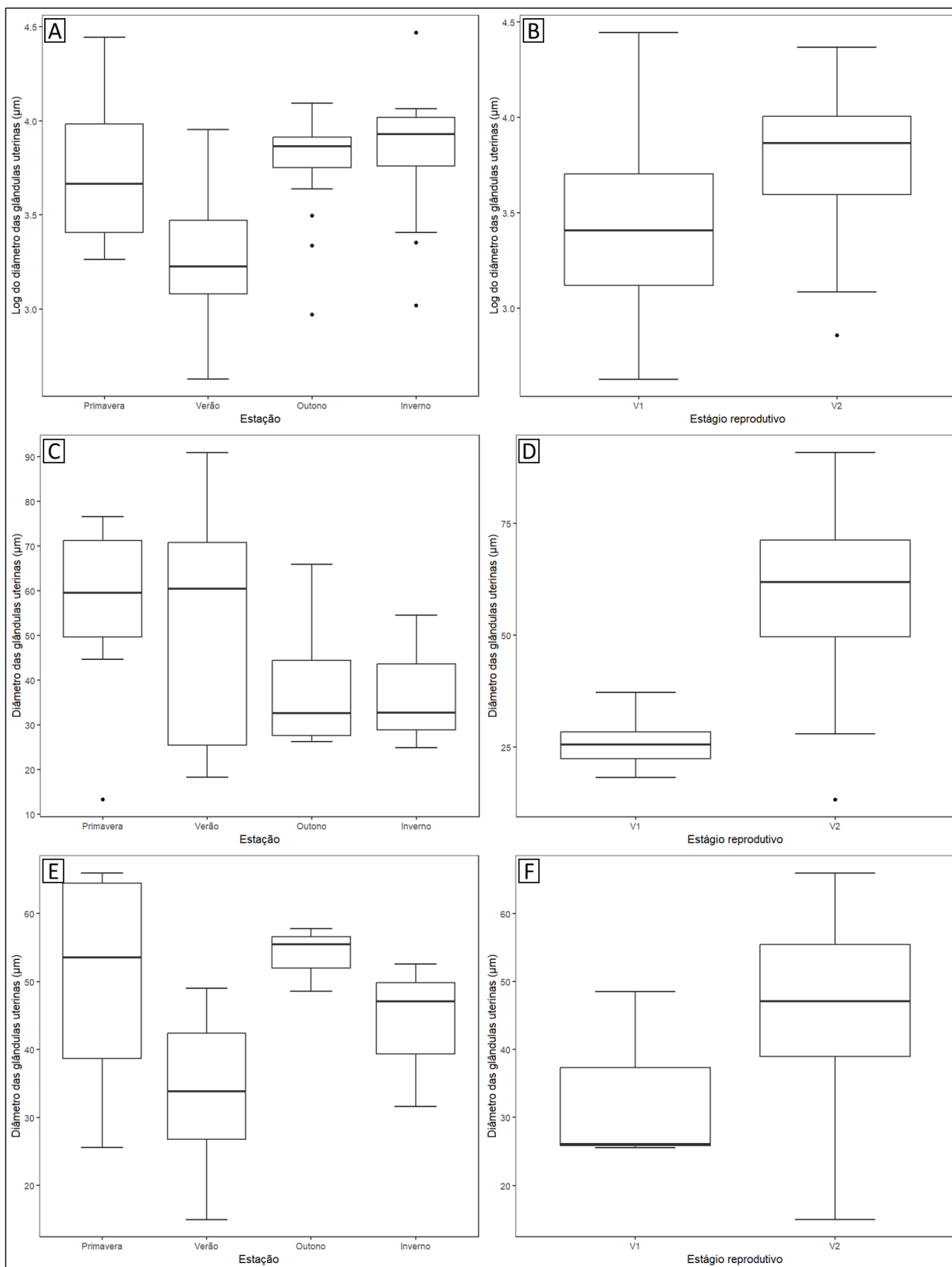
Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 31 – Variação da altura do epitélio uterino (μm) considerando as estações do ano e o estágio reprodutivo das fêmeas. A, B) *C. bicarinatus*; C, D) *C. flavolineatus*; E, F) *C. laevicollis*. V1 = folículos pré-vitelogênicos, V2 = folículos vitelogênicos.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 32 – Variação do diâmetro das glândulas uterinas (μm) considerando as estações do ano e o estágio reprodutivo das fêmeas. A, B) *C. bicarinatus*; C, D) *C. flavolineatus*; E, F) *C. laevicollis*. V1 = folículos pré-vitelogênicos, V2 = folículos vitelogênicos.

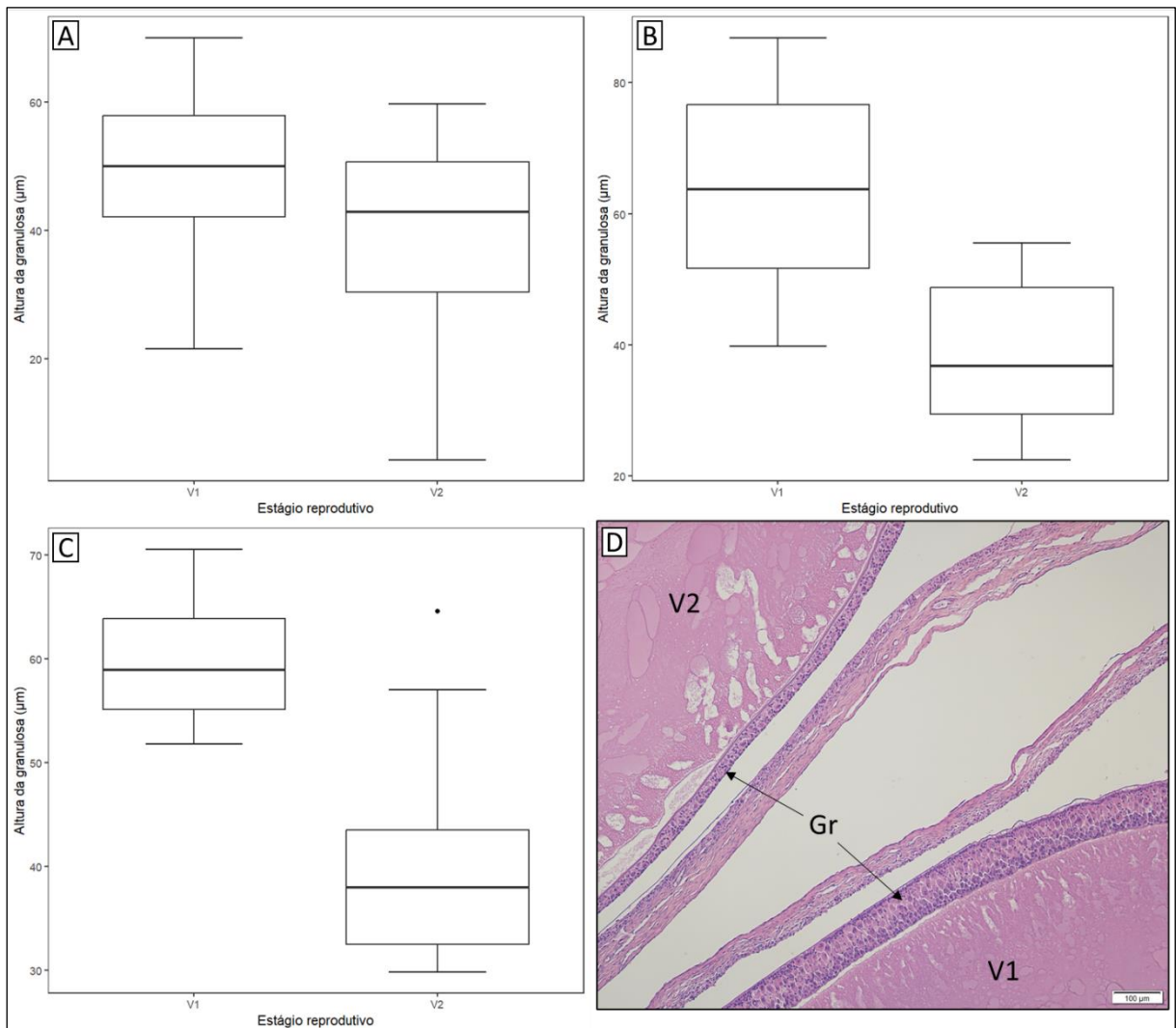


Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.4.5 Variação na camada da granulosa

Foram analisadas um total de 71 fêmeas (*C. bicarinatus*, $n = 45$, *C. flavolineatus*, $n = 14$ e *C. laevicollis*, $n = 12$) para avaliar a variação na altura da camada da granulosa de acordo com o estágio reprodutivo (vitelogênese ou pré-vitelogênese). Foi observada diferença significativa em *C. bicarinatus* ($t_{(43)} = 2,5409$, $p = 0,0147$; Figura 33A), *C. flavolineatus*, ($t_{(12)} = 3,1415$, $p = 0,008$; Figura 33B) e *C. laevicollis* ($t_{(10)} = 2,6636$, $p = 0,0237$; Figura 33C), onde folículos vitelogênicos apresentam a camada da granulosa menos espessa do que os folículos pré-vitelogênicos (Figura 33D).

Figura 33 – Variação na altura da camada da granulosa (μm) de acordo com o estágio reprodutivo das fêmeas. A) *C. bicarinatus*; B) *C. flavolineatus*; C) *C. laevicollis*; D) Histologia (hematoxilina-eosina) do ovário de *C. laevicollis* evidenciando: V1 = folículo pré-vitelogênico, V2 = folículo vitelogênico, Gr = camada da granulosa.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.4.6 Estocagem de espermatozoides e UMC

***Chironius bicarinatus*.** Do total de fêmeas analisadas, trinta apresentaram espermatozoides em alguma região do oviduto e/ou a presença de UMC (Tabela 11). A estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior (Figura 35A, B) foi encontrada em nove fêmeas. Seis delas em V2, duas em V1 e uma fêmea ovígera e em V1. Em cinco fêmeas, foram encontrados espermatozoides no lúmen do útero glandular (Figura 35C) ascendendo em direção ao infundíbulo posterior. Quatro delas estavam em V2 e uma em V1. A estocagem de espermatozoides na junção útero-vaginal (Figura 35D, E) foi encontrada em dezessete fêmeas em todas as estações. Quinze delas em V2, uma em V1 e outra ovígera e em V1. A presença da UMC (Figura 34; 35F, G) foi confirmada principalmente por meio das análises microscópicas e foi observada em 14 fêmeas coletadas durante todas as estações. Onze delas estavam em V2 e três em V1. O grau do enrolamento da junção útero-vaginal foi fraco e nem sempre se apresentou visível macroscopicamente. Onze fêmeas coletadas ao longo do ano estavam com espermatozoides na vagina (Figura 35H) indicando cópula recente. Nove delas estavam em V2, uma em V1 e outra fêmea ovígera e em V1.

Figura 34 – UMC observada em fêmeas de *C. bicarinatus*. A, B) Macroscopia da UMC (outono e inverno); C, D, E) Microscopia (hematoxilina-eosina) do UMC evidenciando hélice curta em formato ondular (outono e inverno, aumento de 20x). L = Lúmen, Mc = camada muscular circular interna, MI = camada muscular longitudinal externa, Sr = serosa, UMC = *uterine muscular coiling*, Vag = vagina.

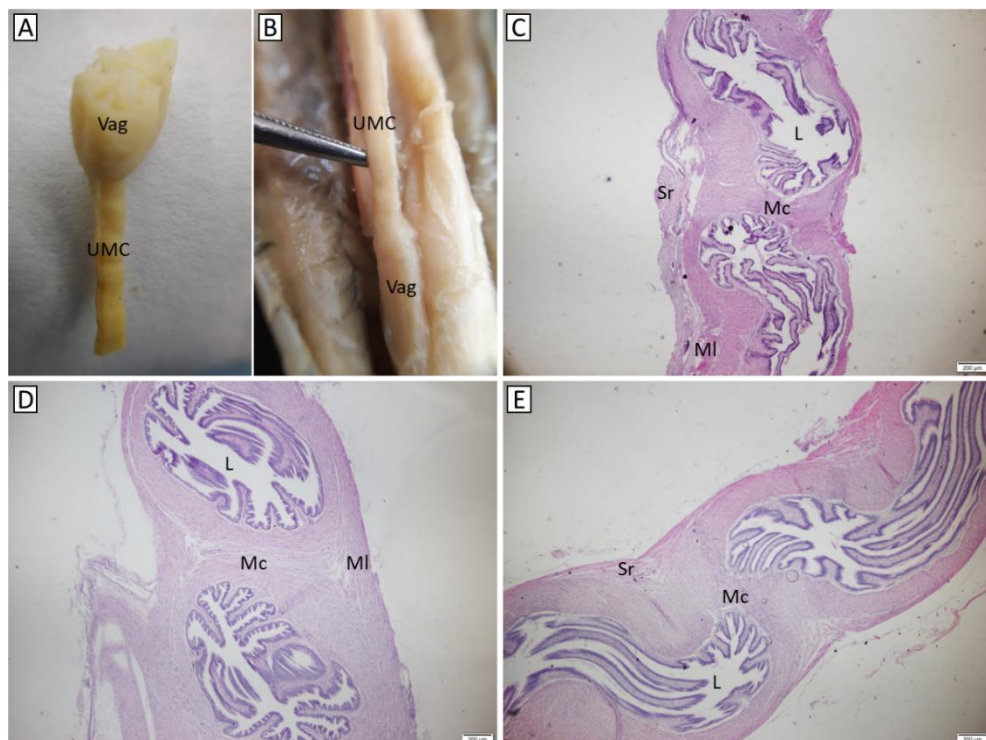
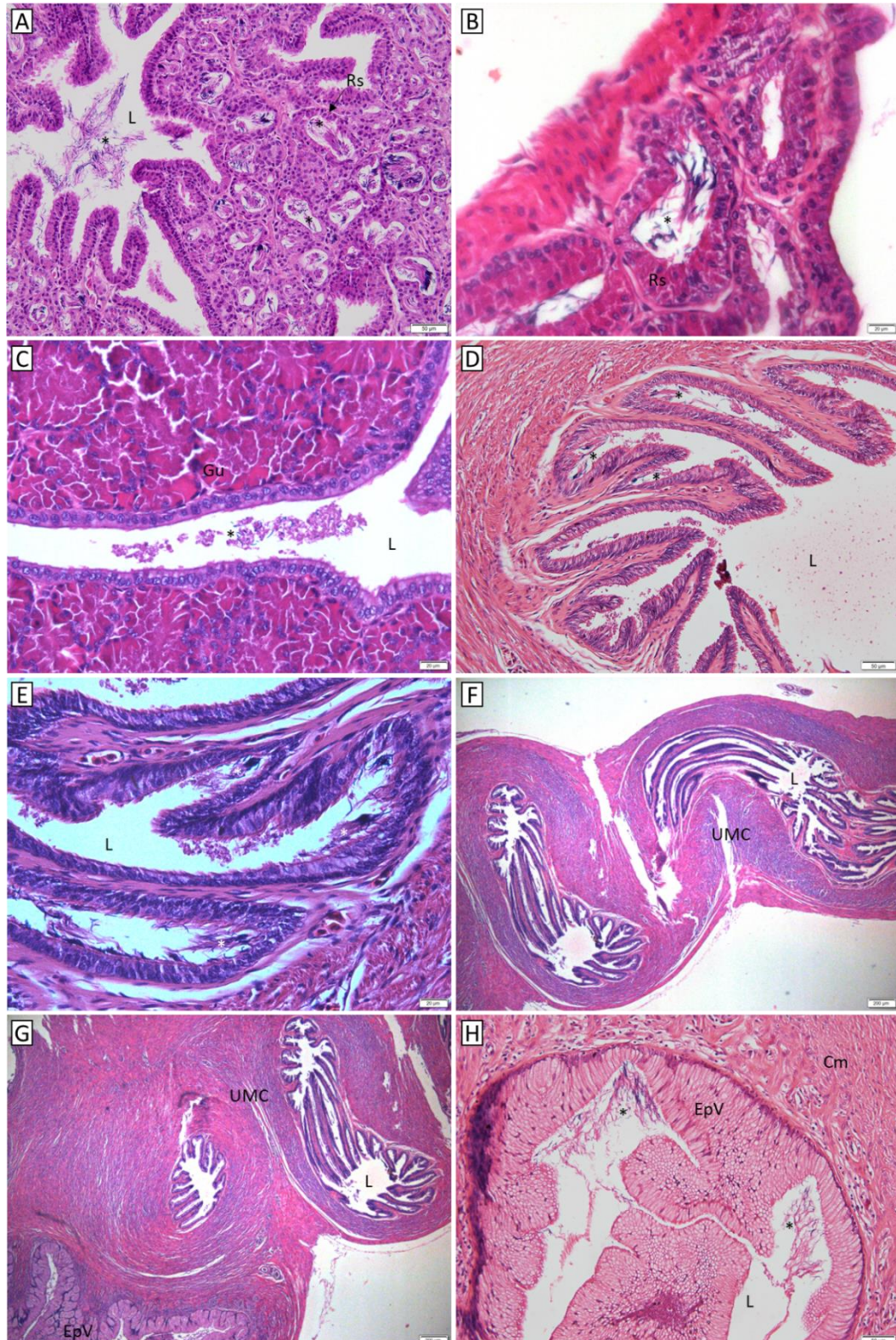


Tabela 11 – Estocagem de espermatozoides e presença da UMC nas fêmeas de *C. bicarinatus*. ER = estágio reprodutivo, V1 = folículos pré-vitelogênicos, V2 = folículos vitelogênicos, Spz IP = espermatozoides estocados no infundíbulo posterior, Spz UG = espermatozoides no útero glandular, Spz JUV = espermatozoides estocados na junção útero-vaginal, Spz Vag = espermatozoides na vagina, UMC = formação do *uterine muscular coiling*, Sinais negativos (-) indicam ausência, Sinais positivos (+) indicam presença.

Estação	Voucher	ER	CRC (mm)	Spz IP	Spz UG	Spz JUV	UMC	Spz Vag
Primavera	CHUPF 1144	V2	650	-	-	-	+	-
	LECZ 78410	V2	787	+	+	-	-	-
	LECZ 78562	V2	960	+	-	-	-	-
	LECZ 86185	V1 + ovos	835	+	-	-	-	-
	LECZ 90383	V1 + ovos	920	-	-	+	-	+
Verão	LECZ 89681	V1	762	-	-	-	+	-
	LECZ 90725	V2	817	+	+	-	-	-
	ZUEC 753	V2	816	+	-	-	+	-
	ZUEC 1346	V2	1130	-	-	+	-	+
Outono	LECZ 66998	V2	650	-	-	-	+	-
	LECZ 70958	V2	792	+	-	+	-	+
	LECZ 82415	V1	814	+	+	+	+	+
	LECZ 85567	V2	880	-	+	+	-	+
	LECZ 88103	V2	730	-	+	+	+	+
	LECZ 89268	V2	641	-	-	+	-	+
	LECZ 89362	V2	1011	-	-	+	-	-
	LECZ 89368	V2	875	-	-	+	+	+
	LECZ 89911	V2	631	-	-	-	+	-
	MNRJ 13120	V2	852	-	-	+	-	+
Inverno	LECZ 71276	V2	807	-	-	+	-	+
	LECZ 87415	V2	734	-	-	+	+	+
	LECZ 88566	V2	782	-	-	-	+	-
	MCP 17452	V2	888	-	-	+	-	-
	MCP 9729	V2	811	-	-	+	-	-
	MHNCI 394	V1	757	-	-	-	+	-
	MHNCI 1878	V2	901	-	-	+	+	-
	MHNCI 1879	V2	796	+	-	+	+	-
	MHNCI 5330	V2	842	-	-	+	-	-
	MBML 2153	V1	775	+	-	-	-	-
	MBML 4879	V2	756	-	-	-	+	-

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 35 – Espermatozoides ao longo do oviduto de fêmeas de *C. bicarinatus* (hematoxilina-eosina). A, B) Infundíbulo posterior (verão, 20x; primavera, 40x), C) Útero glandular (primavera, 40x), D, E) Junção útero-vaginal (outono, 20x; outono, 40x), F, G) UMC (outono, 4x), H) Vagina (outono, 20x). Cm = camada muscular, EpV = epitélio vaginal, Gu = glândulas uterinas, L = lúmen, Rs = receptáculo de espermatozoides, UMC = uterine muscular coiling, (*) indica presença de espermatozoides.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

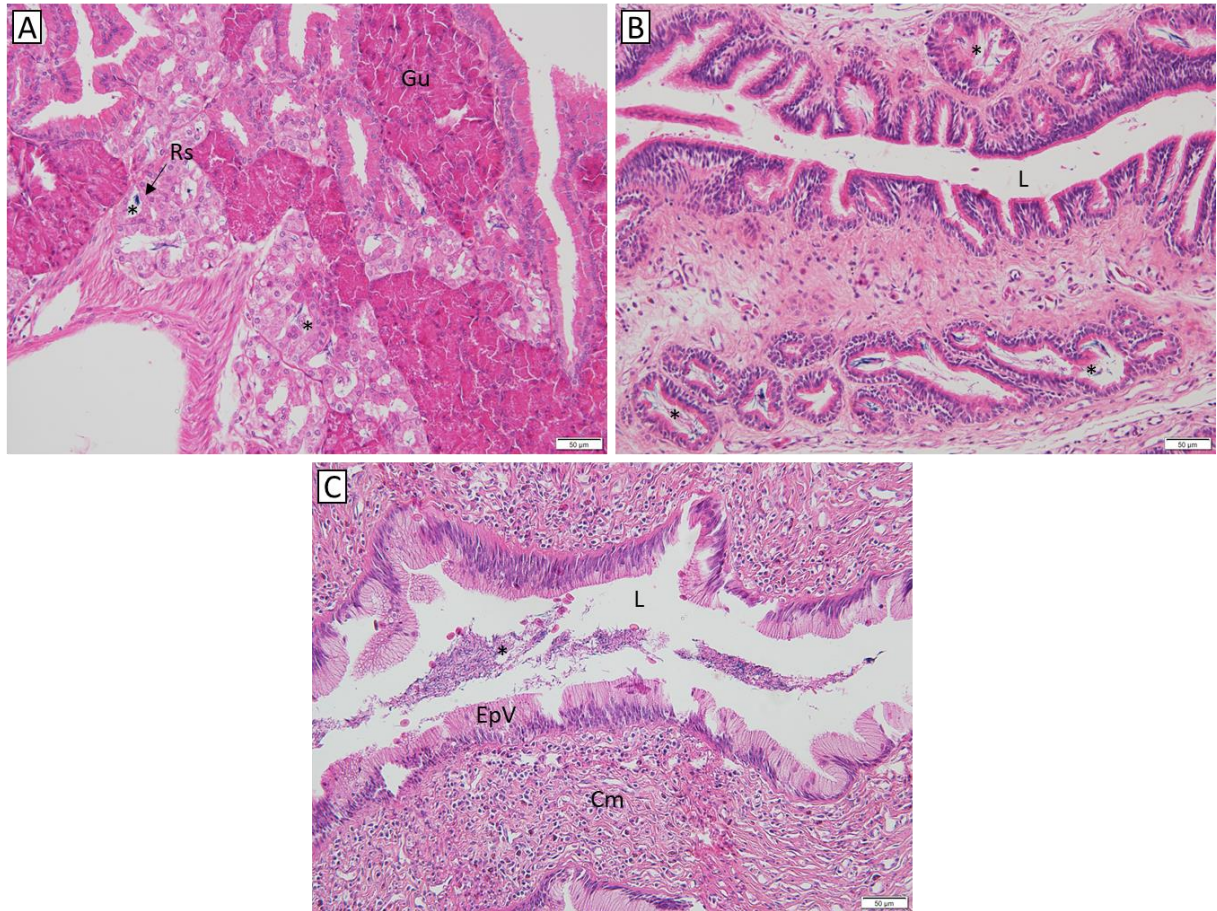
***Chironius flavolineatus*.** Do total de fêmeas analisadas, 13 delas apresentaram espermatozoides em alguma região do oviduto (Tabela 12). A estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior (Figura 36A) foi encontrada em sete fêmeas. Seis delas estavam em V2 e apenas uma em V1. Em nenhuma fêmea foram observados espermatozoides ao longo do útero glandular (Tabela 12). A estocagem de espermatozoides na junção útero-vaginal (Figura 36B) foi encontrada em oito fêmeas. Sete delas em V2 e uma em V1. Dez fêmeas possuíam espermatozoides na vagina (Figura 36C) indicando cópula recente. Nove delas estavam em V2 e apenas uma em V1, coletadas na primavera, verão e inverno.

Tabela 12 – Estocagem de espermatozoides nas fêmeas de *C. flavolineatus*. ER = estágio reprodutivo, V1 = folículos pré-vitelogênicos, V2 = folículos vitelogênicos, Spz IP = espermatozoides estocados no infundíbulo posterior, Spz UG = espermatozoides no útero glandular, Spz JUV = espermatozoides estocados na junção útero-vaginal, Spz Vag = espermatozoides na vagina, Sinais negativos (-) indicam ausência, Sinais positivos (+) indicam presença, (*) indica que só foi observado um único espermatozoide.

Estação	Voucher	ER	CRC (mm)	Spz IP	Spz UG	Spz JUV	Spz Vag
Primavera	FUNED 428	V2	620	-	-	+	+
	FUNED 3722	V2	735	+	-	+	+
	LECZ 91792	V2	670	-	-	+	+
	MCP 16861	V2	714	-	-	+	+
	MNRJ 17271	V2	685	+	-	+	+
	ZUFMS 1379	V2	663	+	-	-	+
	ZUFMS 1380	V2	642	+	-	-	+
Verão	MNRJ 12901	V2	678	-	-	+	+
	ZUEC 2470	V1	660	-	-	+	+
	ZUFMS 3643	V2	643	+	-	-	-
Outono	FUNED 392	V2	700	*+	-	-	-
Inverno	CHUPE 396	V1	626	+	-	-	-
	ZUFMS 3647	V2	517	-	-	+	+

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 36 – Espermatozoides ao longo do oviduto de fêmeas de *C. flavolineatus* (hematoxilina-eosina). A) Infundíbulo posterior (primavera, 20x), B) Junção útero-vaginal (primavera, 20x), C) Vagina (inverno, 20x). Cm = camada muscular, EpV = epitélio vaginal, Gu = glândulas uterinas, L = lúmen, Rs = receptáculo de espermatozoides, (*) indica presença de espermatozoides.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

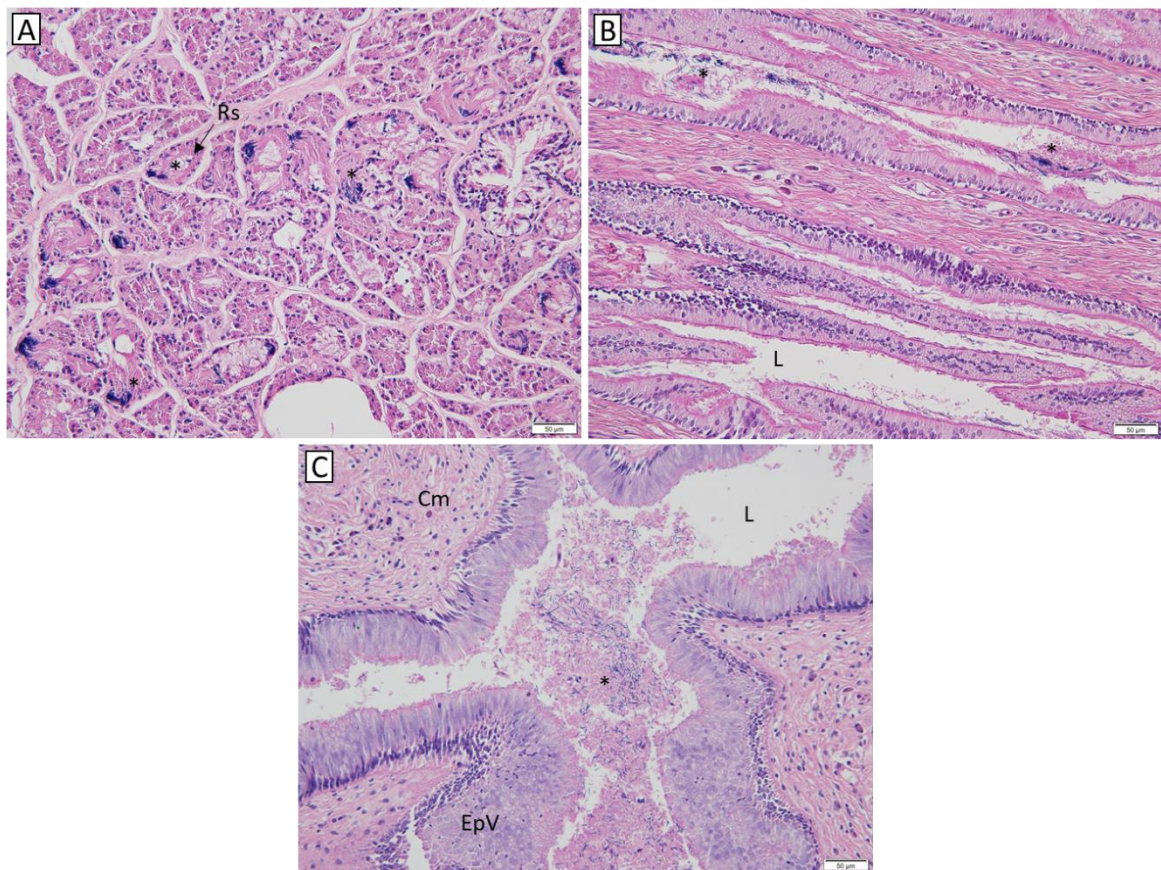
***Chironius laevicollis*.** Do total de fêmeas analisadas, 7 delas apresentaram espermatozoides em alguma região do oviduto (Tabela 13). A estocagem no infundíbulo posterior (Figura 37A) foi encontrada em duas fêmeas coletadas durante a primavera e verão. Ambas estavam em V2, porém uma delas também estava ovígera. Não foram observados espermatozoides ao longo do útero glandular de nenhuma fêmea analisada (Tabela 13). A estocagem de espermatozoides na junção útero-vaginal (Figura 37B) foi encontrada em três fêmeas coletadas durante o outono e inverno e todas elas estavam em V2. Quatro fêmeas coletadas durante a primavera, outono e inverno possuíam espermatozoides na vagina (Figura 37C). Três delas estavam em V2 e em uma delas, não foi possível determinar o estágio folicular.

Tabela 13 – Estocagem de espermatozoides nas fêmeas de *C. laevicollis*. ER = estágio reprodutivo, V1 = folículos pré-vitelogênicos, V2 = folículos vitelogênicos, Spz IP = espermatozoides estocados no infundíbulo posterior, Spz UG = espermatozoides no útero glandular, Spz JUV = espermatozoides estocados na junção útero-vaginal, Spz Vag = espermatozoides na vagina, Sinais negativos (-) indicam ausência, Sinais positivos (+) indicam presença.

Estação	Voucher	ER	CRC (mm)	Spz IP	Spz UG	Spz JUV	Spz Vag
Primavera	MHNCI 4783	V2	1263	-	-	-	+
	MHNCI 14060	V2 + ovos	1454	+	-	-	-
	MHNCI 15830	-	1460	-	-	-	+
Verão	MNRJ 19741	V2	1470	+	-	-	-
Outono	LECZ 87017	V2	1650	-	-	+	+
Inverno	LECZ 88569	V2	1156	-	-	+	-
	MBML 3313	V2	1222	-	-	+	+

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 37 – Espermatozoides ao longo do oviduto de fêmeas de *C. laevicollis* (hematoxilina-eosina). A) Infundíbulo posterior (primavera, 20x), B) Junção útero-vaginal (outono, 20x), C) Vagina (outono, 20x). Cm = camada muscular, EpV = epitélio vaginal, Gu = glândulas uterinas, L = lúmen, Rs = receptáculo de espermatozoides, (*) indica presença de espermatozoides.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

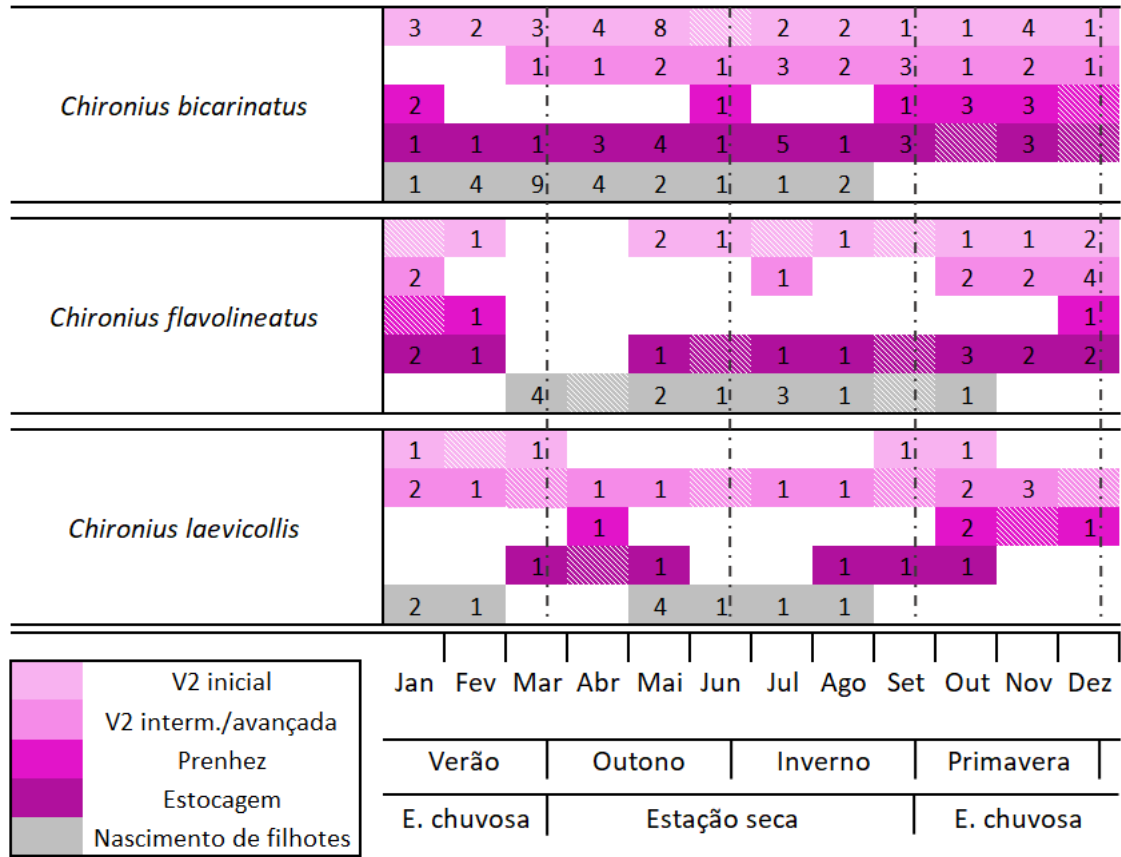
4.4.7 Resumo dos ciclos reprodutivos das fêmeas

Em *C. bicarinatus* fêmeas em vitelogênese intermediária/avançada foram observadas entre outono e primavera (Figura 38). Foi observada uma variação significativa em todas as medidas microscópicas realizadas. As fêmeas coletadas entre o outono e primavera tiveram as medidas da altura do epitélio do infundíbulo posterior, do útero glandular e o diâmetro das glândulas uterinas maiores do que as fêmeas coletadas no verão. Além disso, fêmeas vitelogênicas tiveram médias maiores na altura do epitélio do infundíbulo posterior, do útero glandular e no diâmetro das glândulas uterinas em comparação com as fêmeas pré-vitelogênicas.

Em *C. flavolineatus* fêmeas com folículos em vitelogênese intermediária/avançada foram encontradas principalmente na estação chuvosa (Figura 38). Em relação às análises estatísticas microscópicas, foi observada variação somente no diâmetro das glândulas uterinas quando comparada entre os estágios reprodutivos, onde as fêmeas vitelogênicas apresentaram glândulas mais hipertrofiadas que as fêmeas pré-vitelogênicas. Já em *C. laevicollis*, fêmeas com folículos em vitelogênese intermediária/avançada foram observadas em alguns meses do ano (Figura 38). Foi encontrada variação significativa somente na altura do epitélio infundibular, a qual foi maior durante a primavera em comparação ao inverno.

Em *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus*, fêmeas ovígeras estiveram concentradas principalmente na estação chuvosa e o nascimento de filhotes ocorre entre janeiro-agosto e março-outubro, respectivamente (Figura 38). Já em *C. laevicollis*, fêmeas ovígeras foram encontradas durante a primavera e outono e o recrutamento ocorre no verão e outono-inverno (Figura 38). A estocagem de espermatozoides ocorre de forma estendida ao longo do ano nas três espécies (Figura 38).

Figura 38 – Resumo dos eventos do ciclo reprodutivo das fêmeas de *Chironius*. Os números dentro das caixas indicam a amostra observada para cada evento do ciclo reprodutivo. As células hachuradas representam inferências.

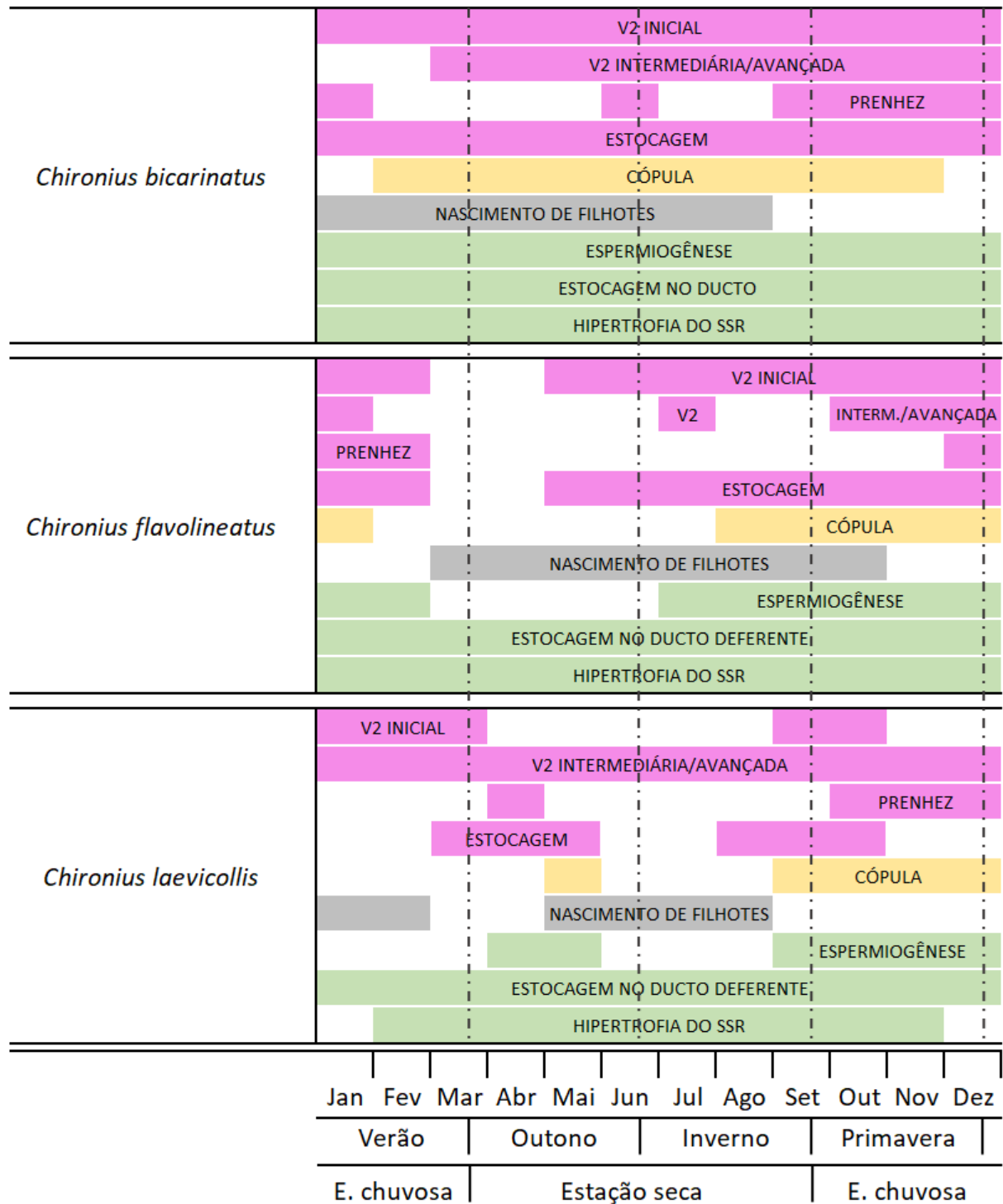


Fonte: Araújo, G. S. 2023

4.5 Resumo dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas das espécies de *Chironius*

A Figura 39 mescla os resultados apresentados neste trabalho referente aos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Chironius*. O período de cópula foi inferido a partir da observação de espermatozoides na vagina das fêmeas.

Figura 39 – Resumo dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Chironius*.



4.6 Comportamentos reprodutivos

A Tabela 14 apresenta um compilado de registros de comportamentos reprodutivos das espécies estudadas, já publicados na literatura e dados do presente estudo.

Em *C. bicarinatus*, o combate entre machos (Figura 40) foi observado em todas as estações do ano, porém em maior frequência durante o outono. A corte para esta espécie foi observada durante a primavera e a cópula (Figura 41A) ocorre durante todas as estações do ano (ver Figura 39). Já para *C. flavolineatus*, existe um único registro publicado que relata agregação entre os indivíduos durante a primavera (Figura 41B), e a cópula ocorre do final do inverno até o início do verão (ver Figura 39). Em *C. laevicollis*, combate entre machos foi observada durante a primavera e verão. A cópula nesta espécie (Figura 41C) ocorre durante o outono e primavera (ver Figura 39).

Tabela 14 – Eventos reprodutivos observados nas espécies estudadas.

Espécie	Evento observado	Data	Estação	Localidade	Referência
<i>C. bicarinatus</i>	Combate ritual	15/Maio/2009	Outono	Guarapari - ES	presente estudo
	Combate ritual	Abril/2011	Outono	Pontal do Atalaia, Arraial do Cabo - RJ	presente estudo
	Combate ritual	12/Março/2016	Verão	Ribeirão Preto - SP	presente estudo
	Combate ritual	17/Julho/2018	Inverno	Praia Mansa, Ilhabela - SP	presente estudo
	Combate ritual	10/Abril/2019	Outono	Praia da Cidreira, RS	presente estudo
	Combate ritual	22/Março/2020	Outono	Serra do Japi, Jundiá - SP	presente estudo
	Combate ritual	26/Março/2021	Outono	Pq. Nacional Serra dos Órgãos, Teresópolis - RJ	presente estudo
	Combate ritual	12/Abril/2021	Outono	Braço do Norte - SC	presente estudo
	Combate ritual	Novembro/2000	Primavera	Serra do Mar, Tapiraí - SP	Almeida-Santos et al., 2002
	Corte	Outubro/2017	Primavera	Museu Biológico do Instituto Butantan - SP	presente estudo
	Cópula	11/Abril/1995	Outono	-	Marques et al., 2009
	Cópula	11/Abril/2003	Outono	São Lourenço da Serra - SP	Marques et al., 2009
	Cópula	29/Abril/2003	Outono	-	Marques et al., 2009
	Cópula	10/Abril/2008	Outono	São Lourenço da Serra - SP	Marques et al., 2009
<i>C. flavolineatus</i>	Corte/agregação	08/Outubro/1997	Primavera	Rio Mocambinho, Jaíba - MG	Feio et al., 1999
<i>C. laevicollis</i>	Cópula	30/Setembro/2019	Primavera	Pq. Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis - SC	Araújo et al., 2022
	Combate ritual	15/Janeiro/2020	Verão	Biguaçu - SC	Almeida-Santos et al., in prep
	Combate ritual	29/Novembro/2020	Primavera	Arraial de Sana, Macaé - RJ	Almeida-Santos et al., in prep

Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 40 – Combate entre machos de *C. bicarinatus* em Guarapari, Espírito Santo (outono) registrado e disponibilizado por Cacá Lima. A, B, C) Alinhamento e displays verticais; C) tentativa de topping; E) queda e recuperação em seguida; F) display vertical com hiperextensão dorsal.



Fonte: Araújo, G. S. 2023

Figura 41 – Comportamento reprodutivo das espécies estudadas. A) Cópula de *C. bicarinatus* em São Lourenço da Serra, São Paulo (outono); B) Corte de *C. flavolineatus* em Jaíba, Minas Gerais (primavera); C) Cópula de *C. laevicollis* em Florianópolis, Santa Catarina (primavera).



Fonte: Marques et al. (2009), Feio et al. (1999), Araújo et al. (2022)

5 DISCUSSÃO

5.1 Padrão de atividade

Diversos fatores podem influenciar, direta ou indiretamente, o padrão de atividade de indivíduos na natureza, tais como: fatores climáticos (e.g. temperatura, pluviosidade e fotoperíodo), disponibilidade de alimento e período reprodutivo (GIBBONS; SEMLITSCH, 1987; PIZZATTO; MARQUES, 2006). Os machos exibem um pico de atividade durante o período de acasalamento, que está relacionado com a busca pelas fêmeas e comportamento de combate, nas espécies que o exercem tal comportamento (SHINE, 1979; ALDRIDGE; BROWN, 1995; MARQUES et al., 2009; ALMEIDA-SANTOS et al., 2017).

Os machos de *C. flavolineatus*, apresentaram um pico de atividade significativo durante o bimestre de janeiro e fevereiro em comparação aos meses de março a junho. Essa diferença pode estar relacionada ao início da espermatogênese que é observada no outono, período em

que se observa uma queda da temperatura e níveis de precipitação, acarretando uma menor atividade dos indivíduos durante estes meses. Um aumento na atividade dos machos é observada durante os meses de julho e agosto, quando entram no estágio de espermiogênese que se estende até fevereiro (pico de atividade observada) e copulam dentro deste período, tornando os machos mais ativos em busca de parceiras e agregações reprodutivas (SHINE, 1979; FEIO et al., 1999). Embora não tenha sido significativo, um maior número de fêmeas foi coletado durante novembro e dezembro, período em que estão carregando folículos em vitelogênese avançada ou ovos e, conseqüentemente estão mais robustas e pesadas, o que diminui a sua capacidade de locomoção (SHINE, 1980; SEIGEL et al., 1987), além disso, fêmeas ovígeras apresentam uma maior atividade quando estão termorregulando ou em busca de locais adequados para nidificação (SHINE, 1979; PIZZATTO; MARQUES, 2006). Um fator que poderia explicar a diferença estatística encontrada no padrão de atividade de *C. flavolineatus*, em relação à diferença não observada nas demais espécies, seria o padrão termopluviométrico, uma vez que as áreas de Cerrado em que *C. flavolineatus* habita possui um período de seca entre 1 a 8 meses, quando comparada às áreas de Mata Atlântica que as demais espécies habitam (sem seca) (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007).

Em contrapartida, não foi observada diferença na distribuição de machos e fêmeas de *C. bicarinatus* e isso pode estar relacionado aos eventos reprodutivos estendidos na espécie, uma vez que a espermiogênese e vitelogênese ocorrem ao longo de todo o ano, bem como os comportamentos de combate entre machos e cópula, tornando estes animais mais ativos durante todas as estações para interações agonísticas entre machos rivais e encontro de parceiros reprodutivos (PIZZATTO; MARQUES, 2006). Para *C. laevicollis* também não foi observada diferença estatística na distribuição de machos e fêmeas ao longo do ano. Entretanto, é notável maior atividade de machos durante setembro e outubro, período em que estão em espermiogênese e o acasalamento está acontecendo (ARAÚJO et al., 2022b). Para as fêmeas, maior atividade foi observada entre novembro e fevereiro, período em que estão carregando folículos em vitelogênese avançada ou ovos, e provavelmente procurando locais adequados para oviposição ou termorregulando (SHINE, 1979; SEIGEL et al., 1987; RIBEIRO-DA-COSTA et al., 2005).

5.2 Maturidade e dimorfismo sexual

De modo geral, o tamanho mínimo atingido na maturação sexual de *Chironius* foi semelhante ao descrito na literatura para outros colubrídeos que habitam os mesmos biomas

aqui estudados (e.g. *Palusophis bifossatus*, MARQUES; MURIEL, 2007; *Oxybelis fulgidus*, SCARTOZZONI et al., 2009; *C. quadricarinatus*, PINTO et al., 2010; *Spilotes pullatus*, MUNIZ-DA-SILVA, 2012; *C. fuscus*, NASCIMENTO et al., 2013; *Mastigodryas boddaerti*, SIQUEIRA et al., 2013). O tamanho em que machos e fêmeas de *C. bicarinatus* e *C. laevicollis* atingem a maturidade sexual foram descritos pela primeira vez no presente estudo. Em *C. flavolineatus*, o menor macho sexualmente maduro media 499 mm de CRC, tamanho menor do que o observado em estudo anterior (507 mm de CRC; PINTO et al., 2010). Para as fêmeas desta mesma espécie, o menor indivíduo maduro media 517 mm de CRC, menor do que os 606 mm descritos por Pinto et al. (2010). Essa diferença está possivelmente atrelada ao método utilizado pelos autores, contando apenas com observações macroscópicas e não uma análise microscópica dos órgãos reprodutores.

O tamanho de maturação sexual (relativo ao CRC médio dos adultos) foi semelhante entre os sexos em *C. flavolineatus* (76 vs. 78%) e *C. laevicollis* (74 vs. 75%). *Chironius bicarinatus* diferiu desse padrão e os machos atingiram a maturidade sexual com tamanho relativamente menor do que as fêmeas (61 vs. 71% do CRC médio dos adultos). Pinto et al. (2010) e Nascimento et al. (2013) avaliaram a maturidade sexual em outras espécies do gênero *Chironius* (e.g., *C. quadricarinatus* e *C. fuscus*) e também relataram que os machos atingem a maturidade sexual com tamanho menor do que as fêmeas (504 e 530 mm para machos e 514 e 576 mm para fêmeas, respectivamente). O tamanho relativo ao CRC foi aproximado entre as espécies aqui estudadas, e são similares ao observado para demais congêneres.

Das espécies estudadas, *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* apresentaram dimorfismo sexual nas variáveis morfométricas de comprimento rostro-cloacal e comprimento da cauda, onde as fêmeas possuem tamanhos corporais maiores que os machos, os quais, apresentam uma cauda maior que as fêmeas. Em *C. bicarinatus* o dimorfismo sexual nas variáveis mencionadas acima parece ser ausente. Os dados obtidos aqui para *C. flavolineatus* corroboram com observações prévias (PINTO et al., 2008; 2010). Já em *C. laevicollis* e *C. bicarinatus*, nossos dados divergem dos obtidos em estudos anteriores, onde machos de *C. bicarinatus* apresentaram tamanho corporal e caudal maior que as fêmeas, e em *C. laevicollis* não foi encontrado dimorfismo sexual nessas características (RODRIGUES, 2007; BANCI et al., 2022). Essa diferença pode estar relacionada com a utilização de um tamanho médio estimado por Pinto et al. (2010) para a espécie *C. flavolineatus* (700 mm de CRC) como base para determinação da maturidade sexual em ambas as espécies. Isso pode ter acarretado a exclusão de exemplares maduros de *C. bicarinatus* e a adição de exemplares imaturos de *C. laevicollis* na amostragem dos autores.

Fêmeas com CRC maior que machos também ocorrem em outros congêneres, tais como *C. quadricarinatus* e *C. exoletus* (RODRIGUES, 2007; PINTO et al., 2008; BANCI et al., 2022). Por outro lado, o inverso é observado em outras espécies do mesmo grupo, como *C. foveatus* e *C. fuscus* (RODRIGUES, 2007; NASCIMENTO et al., 2013; BANCI et al., 2022). Além disso, a ausência de dimorfismo sexual no tamanho corporal, observado em *C. bicarinatus* no presente estudo, também pode ser uma característica que ocorre no grupo.

Em relação às variáveis morfométricas da cabeça (comprimento, largura e altura), fêmeas de *C. laevicollis* apresentaram tamanhos maiores que os machos em todas as características. Já em *C. bicarinatus*, a única variável que apresentou dimorfismo sexual foi a altura da cabeça. Esses dados corroboram com estudos anteriormente realizados (RODRIGUES, 2007; BANCI et al., 2022). Em *C. flavolineatus*, fêmeas apresentaram o Ccab maior que os machos, e o inverso ocorreu em relação ao Lcab, diferente dos resultados obtidos em análises prévias, onde não foi observado dimorfismo nessas características (Pinto et al., 2008). De maneira geral, os dados obtidos no presente estudo são semelhantes, em alguns aspectos, aos observados em outros congêneres (RODRIGUES, 2007; PINTO et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2013; BANCI et al., 2022).

De modo geral, na comparação interespecífica, machos e fêmeas de *C. laevicollis* possuem maiores tamanhos em todas as variáveis analisadas, ao passo que *C. flavolineatus* possuem os menores tamanhos observados. Em estudos anteriores, também foi observado que *C. laevicollis* atinge tamanhos relativamente maiores que outros congêneres da Mata Atlântica (RODRIGUES, 2007; BANCI et al., 2022).

É importante ressaltar que os estudos realizados anteriormente acerca da maturidade e dimorfismo sexual no grupo (RODRIGUES, 2007; PINTO et al., 2008; 2010; BANCI et al., 2022) baseiam-se apenas em análises macroscópicas das gônadas ou em valores sugeridos pela literatura para inferir o tamanho da maturação sexual. Isso pode não refletir o verdadeiro tamanho mínimo na maturação de cada sexo e espécie, além de levar ao erro de adicionar indivíduos imaturos ou excluir exemplares maduros da amostragem.

O índice de dimorfismo sexual no tamanho (SSD) foi de 0,069 para *C. flavolineatus* e 0,086 para *C. laevicollis*. Esse padrão do SSD direcionado para as fêmeas (i.e., sugerindo que as fêmeas são ligeiramente maiores que os machos) também foi observado para *C. flavolineatus* e *C. quadricarinatus* em um estudo prévio (PINTO et al., 2010), bem como para outras espécies de colubrídeos (e.g. *Palusophis bifossatus*, MARQUES; MURIEL, 2007; LEITE et al., 2009; *Oxybelis fulgidus*, SCARTOZZONI et al., 2009; *Oxybelis aeneus*, MESQUITA et al., 2010; *Mastigodryas boddaerti*, SIQUEIRA et al., 2013). Em *C. bicarinatus* o SSD foi de -0,027,

sugerindo que os machos são ligeiramente maiores que as fêmeas. O SSD com valor negativo também pode ser observado em outros congêneres, como *C. fuscus* e *C. foveatus* (-0,14 e -0,07, respectivamente; calculado a partir dos valores médios de CRC fornecidos por RODRIGUES, 2007 e NASCIMENTO et al., 2013), bem como para outros colubrídeos (e.g. -0,032 *Spilotes pullatus*, MUNIZ-DA-SILVA, 2012; -0,14 *Leptophis ahaetulla*, BELLINI et al., 2018).

O dimorfismo sexual no tamanho do corpo pode estar atribuído às forças evolutivas distintas e não exclusivas, tais como: seleção natural, seleção sexual e a seleção de fecundidade (SHINE, 1994; BONNET et al., 1998; BLANCKENHORN, 2005). A seleção sexual tende a favorecer machos com tamanhos maiores que as fêmeas coespecíficas em espécies que apresentam comportamento de combate, isso porque machos maiores geralmente possuem mais sucesso durante as disputas (SHINE, 1994). Por outro lado, a seleção de fecundidade favorece fêmeas com tamanhos maiores que os machos porque elas são capazes de gerar ninhadas mais numerosas ou com filhotes maiores, e estudos com colubrídeos neotropicais têm corroborado essa hipótese (e.g. FOWLER; SALOMÃO, 1994; OLIVEIRA, 2001; PIZZATTO; MARQUES, 2002).

De acordo com Shine (1994) as espécies de colubrídeos que exibem comportamento de combate os machos tendem a apresentar tamanhos corporais (CRC) maior que as fêmeas coespecíficas ou o dimorfismo sexual é ausente. Em relação ao SSD, quando tal comportamento é observado, os machos apresentam um SSD direcionado para os mesmos e inferior a 0,27. Em *C. bicarinatus* não foi observado dimorfismo sexual em relação ao CRC e o resultado do SSD é negativo, sugerindo que machos possam atingir tamanhos maiores que as fêmeas. O comportamento de combate entre machos já foi descrito para esta espécie anteriormente (ver ALMEIDA-SANTOS et al., 2002) e outras sete observações foram registradas no presente estudo, ocorrendo de uma forma bem ritualizada. Esse padrão também é observado em *Spilotes pullatus* (MUNIZ-DA-SILVA, 2012) e *Leptophis ahaetulla* (BELLINI et al., 2018).

Chironius laevicollis apresenta dimorfismo sexual no tamanho (CRC), onde as fêmeas atingem tamanhos maiores que os machos. Juntamente com o resultado positivo do SSD, sugere-se que as fêmeas são relativamente maiores que o sexo oposto. Entretanto, o combate ritual entre machos também foi observado nesta espécie, em dois momentos distintos (ALMEIDA-SANTOS et al., *in prep*). Se levarmos em consideração que o valor do SSD para *C. laevicollis* é inferior a 0,27, podemos inferir que os dados ainda estão corroborando com a hipótese de Shine (1994) para espécies que exibem combate entre machos. Isso também foi observado em *Oxybelis aeneus*, onde fêmeas apresentam tamanhos maiores que os machos, os quais se engajam em combates (MESQUITA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2022a).

Em *C. flavolineatus* foi observado dimorfismo sexual no tamanho (CRC), em que fêmeas apresentaram tamanhos maiores que os machos e o resultado do SSD foi positivo. Em relação ao sistema de acasalamento, a espécie apresenta agregação entre os indivíduos durante o período reprodutivo (FEIO et al., 1999). Esse mesmo padrão foi observado em *Philodryas olfersii*, onde fêmeas possuem tamanhos maiores que os machos e apresentam agregação entre os indivíduos (LEITE et al., 2009; BANCI et al., 2021). Em espécies que apresentam tal comportamento, não é esperado que ocorra combate (SHINE, 1994). É provável que uma certa disputa aconteça, durante as tentativas de copular com a fêmea, porém não de maneira ritualizada como observado nas espécies que possuem o combate como um sistema de acasalamento.

A ausência de dimorfismo sexual somada ao resultado negativo do SSD em *C. bicarinatus*, indica a ação da seleção de fecundidade que favorece fêmeas maiores para produzirem mais ovos, bem como da seleção sexual que favorece machos maiores durante as competições pelo acesso às fêmeas. Em *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, que apresentam dimorfismo sexual e valores positivos do SSD, a pressão evolutiva que parece influenciar o tamanho do corpo é a seleção de fecundidade, favorecendo fêmeas maiores para produzirem ninhadas maiores. Ainda assim, em *C. laevicollis* é possível que também haja a atuação da seleção sexual, uma vez que machos maiores obtêm maior sucesso durante os combates.

5.3 Fecundidade

Os dados sugerem que as fêmeas de *Chironius* possuem uma reprodução anual, uma vez que a proporção de fêmeas reprodutivas foi maior que 70%, para todas as espécies aqui estudadas. Essa hipótese também é reforçada pelo fato de fêmeas ovígeras, das três espécies, apresentarem folículos vitelogênicos nos ovários simultaneamente. Além disso, duas fêmeas de *C. bicarinatus* mantidas em cativeiro (CB01 e CB02) no Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, fizeram a postura de ovos atrésicos durante dois anos consecutivos (CB01: dezembro/2022 $n = 7$, novembro/2023 $n = 1$; CB02: dezembro/2021 $n = 6$, novembro/2022 $n = 4$; Fabiano Andrade, comunicação pessoal), reforçando a reprodução anual. Os resultados obtidos no presente estudo acerca da ovipostura de *C. laevicollis* (novembro e fevereiro) e *C. bicarinatus* (outubro, novembro e dezembro) corroboram com o que foi observado para estas espécies em estudos anteriores (RIBEIRO-DA-COSTA et al., 2005; MARQUES et al., 2009) e, de modo geral, estão de acordo com a época de postura de ovos das espécies de *Chironius*, a qual se concentra na estação chuvosa (*C. carinatus*, *C. exoletus* e *C. grandisquamis*, SOLÓRZANO, 2004; *C. quadricarinatus*, PINTO et al., 2010). Foi observado

em estudos anteriores que o tempo entre a ovipostura e a eclosão dos filhotes de *C. laevicollis*, *C. bicarinatus* e *C. quadricarinatus* pode ser estimada entre 97 a 125 dias (3-4 meses, aproximadamente) (RIBEIRO-DA-COSTA et al., 2005; MARQUES et al., 2009; PINTO et al., 2010).

O tamanho médio da ninhada de *C. bicarinatus* encontrado no presente estudo ($\bar{x} = 7,7$ ovos) foi relativamente próximo ao observado em estudos anteriores ($\bar{x} = 6,3$ em DIXON et al., 1993; $\bar{x} = 7$ em MARQUES, 1998; $\bar{x} = 8,4$ em MARQUES et al., 2009). O tamanho médio da ninhada de *C. laevicollis* observado no presente estudo ($\bar{x} = 13,2$) foi maior do que o encontrado em estudo anterior ($\bar{x} = 11$ em RIBEIRO DA COSTA et al., 2005). Para *C. flavolineatus*, o tamanho médio da ninhada encontrado no presente estudo ($\bar{x} = 3,5$) foi menor do que o observado em estudos prévios ($\bar{x} = 4,7$ em DIXON et al., 1993; $\bar{x} = 5,9$ em PINTO et al., 2010). Possivelmente, essa diferença pode estar associada à amostragem de fêmeas ovígeras encontradas nos estudos prévios (15 e 21, respectivamente) em relação as duas únicas fêmeas ovígeras encontradas no presente estudo.

Chironius bicarinatus apresenta uma fecundidade (tamanho da ninhada) similar à outros congêneres, tais como *C. leucometapus* ($\bar{x} = 6,7$), *C. exoletus* ($\bar{x} = 6,8$), *C. scurrulus* ($\bar{x} = 8,8$) e *C. monticola* ($\bar{x} = 9,2$) (DIXON et al., 1993). Já *C. flavolineatus* possui o tamanho da ninhada similar à *C. fuscus* ($\bar{x} = 4,4$ em DIXON et al., 1993; $\bar{x} = 4,3$ em NASCIMENTO et al., 2013) e *C. quadricarinatus* ($\bar{x} = 5$ em DIXON et al., 1993; $\bar{x} = 5,1$ em PINTO et al., 2010). *Chironius laevicollis* apresenta maior fecundidade quando comparada aos congêneres mencionados anteriormente e isso deve estar relacionado ao tamanho corporal da espécie, sua robustez e utilização do substrato (RODRIGUES, 2007; BANCÍ et al., 2022).

Em *C. bicarinatus*, foi possível observar o *trade-off* entre o número *versus* o tamanho dos ovos. A fêmea ovígera com a menor ninhada observada, continha apenas dois ovos no oviduto esquerdo, os quais tiveram uma média de 53,81 mm de comprimento (53,14 – 54,48 mm). Por outro lado, a fêmea ovígera com a maior ninhada encontrada possuía onze ovos distribuídos em ambos os ovidutos e a média dos ovos foi de 27,38 mm de comprimento (21,09 – 31,33 mm) (Apêndice B). Dados similares foram obtidos por Marques et al. (2009), onde uma fêmea que continha sete ovos nos ovidutos, os quais tiveram uma média de 42,5 mm de comprimento (40,3 – 44,4 mm), foram maiores em relação a outra fêmea que possuía o dobro de ovos ($n = 14$) os quais tiveram uma média de 30,9 mm de comprimento (29,2 – 36 mm). Isso ocorre porque o número ideal para o tamanho da ninhada depende da aptidão materna em vista do armazenamento limitado de energia ou do volume abdominal disponível para a ninhada

(BROWN; SHINE, 2009). Em *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* não foi observada uma variação tão expressiva entre o número *versus* o tamanho dos ovos.

Em *C. bicarinatus*, foi observada correlação significativa entre o tamanho da ninhada considerando os folículos vitelogênicos e o CRC materno. Ao contrário, não foi encontrada correlação entre o número de ovos e o CRC materno. Provavelmente, isso está atrelado à baixa amostragem de fêmeas ovígeras, uma vez que não foi encontrado diferença entre o número de ovos e o número de folículos vitelogênicos. Em *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, não foram encontradas diferenças entre o número de ovos e o número de folículos vitelogênicos. Entretanto, também não foi observada correlação entre estes parâmetros e o CRC materno. No entanto, para estas espécies, isso pode estar relacionado ao baixo *n* amostral tanto de fêmeas vitelogênicas quanto fêmeas ovígeras, uma vez que Pinto et al. (2010) encontraram correlação entre o número de ovos e o CRC materno de *C. flavolineatus*.

5.4 Ciclos reprodutivos

O ciclo reprodutivo de uma espécie pode ser influenciado por diversos fatores, tais como: a temperatura, umidade, fotoperíodo, alimentação e uso do substrato, podendo causar uma extensão em seus eventos reprodutivos (SEIGEL; FORD, 1987; MATHIES, 2011).

Aspectos da biologia reprodutiva de algumas espécies de *Chironius* da América do Sul e Central já foram estudadas por alguns autores (e.g. DIXON et al., 1993; MARQUES, 1998; SOLÓRZANO, 2004; GOLDBERG; WHITTIER, 2007; RODRIGUES, 2007). De modo geral, a maioria dos trabalhos são baseados em análises macroscópicas das gônadas e órgãos acessórios. Goldberg & Whittier (2007) foram os primeiros autores que utilizaram métodos histológicos e análises microscópicas dos testículos, ductos deferentes e ovários para obter resultados referente ao ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de três espécies de *Chironius* da Costa Rica: *C. carinatus*, *C. exoletus* e *C. grandisquamis*. Os machos possuem um período prolongado de espermatogênese e a estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes, ocorrem em fevereiro, de junho a setembro e de novembro a dezembro (GOLDBERG; WHITTIER, 2007). Para as fêmeas, os autores analisaram a deposição de vitelo nos folículos ovarianos e a ocorrência de ovos nos ovidutos. Fêmeas pré-vitelogênicas de *C. carinatus* e *C. grandisquamis* foram encontradas entre junho e agosto, e para cada espécie foi encontrada uma fêmea ovígera (setembro e março, respectivamente) com folículos vitelogênicos nos ovários, indicando a produção de múltiplas ninhadas. Em *C. exoletus*, fêmeas vitelogênicas foram observadas entre junho e setembro, e fêmeas ovígeras em setembro.

Nos machos de *C. bicarinatus*, o ciclo espermatogênico apresenta uma sazonalidade bem marcada entre os estágios. A recrudescência (reativação testicular) tem início no inverno e se estende ao longo da primavera, onde também foi observado um aumento no diâmetro e altura do epitélio do túbulo seminífero. O estágio de espermiogênese (pico de atividade e espermiação) foi concentrado durante o verão ($n = 12$) e outono ($n = 8$), totalizando 67% dos indivíduos analisados neste estágio. A regressão testicular ocorre principalmente durante o outono ($n = 9$), com 52% dos exemplares avaliados. Embora os estágios da espermatogênese sejam bem sazonais, o ducto deferente apresentou estocagem de espermatozoides ao longo de todas as estações, sugerindo que os machos desta espécie têm capacidade de copular em qualquer época do ano. O segmento sexual renal (SSR) se mostrou hipertrofiado ao longo de todo ano, porém a concentração de indivíduos com SSR hipertrofiado e com secreção no lúmen parece ocorrer principalmente no outono, período em que é observado um aumento na altura do epitélio do SSR em relação as demais estações. Esses dados corroboram com os registros de cópula (em maior número no outono) e combate (outono, inverno e primavera) observados nesta espécie (este estudo, ALMEIDA-SANTOS et al., 2002; MARQUES et al., 2009), uma vez que a atividade do testículo e SSR são andrógeno-dependentes e advêm por meio de altos níveis de testosterona na corrente sanguínea (BISHOP, 1959; SCHUETT et al., 2002).

As fêmeas de *C. bicarinatus* apresentam uma sazonalidade bem notada entre os estágios da vitelogênese. A pré-vitelogênese e a vitelogênese inicial foram observadas ao longo de todo o ano. A vitelogênese intermediária e avançada tem início no outono e se estendem até o final da primavera. Estes dados são similares ao observado por Marques et al. (2009). Neste mesmo período, foram observadas as maiores médias das medidas microscópicas do oviduto, indicando que o infundíbulo posterior e o útero glandular também estavam em maior atividade secretora, provavelmente preparando o oviduto materno para a fertilização, desenvolvimento dos embriões e formação da casca do ovo (MEAD et al., 1981; PERKINS; PALMER, 1996; GIRLING, 2002; ROJAS et al., 2015; BRAZ et al., 2018). Fêmeas ovígeras ocorreram principalmente de outubro a janeiro e o recrutamento de filhotes foi observado entre janeiro e agosto. Tais resultados também corroboraram o que foi observado por Marques (1998) e Marques et al. (2009). A estocagem de espermatozoides no oviduto foi observada ao longo do ano, porém em maior proporção durante o outono e inverno (69,56%). As fêmeas de *C. bicarinatus* apresentaram formação da UMC em intensidade fraca ao longo de todas as estações do ano, porém em uma proporção maior durante o outono e inverno (78,57%). Este fato pode estar associado ao período com maior incidência de cópula e estocagem de espermatozoides (este estudo, MARQUES et al., 2009), bem como a concentração de fêmeas em vitelogênese

intermediária/avançada neste mesmo período e, conseqüentemente, variação nos níveis hormonais (YAMANOUE et al., 2004; MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018), embora sejam necessários mais estudos para avaliar essa hipótese (DENARDO; TAYLOR, 2011). Entretanto, a formação do UMC não foi observada obrigatoriamente relacionada às fêmeas vitelogênicas e à estocagem de espermatozoides nesta região. Esses dados são similares aos observados para outras espécies (e.g. *Bothrops leucurus*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta*) que apresentam a formação do UMC (BARROS et al., 2014; SILVA et al., 2020; SOUZA et al., 2020). A provável explicação para a formação de UMC em *C. bicarinatus*, mas não nas demais espécies estudadas, pode estar associado a baixa amostragem de fêmeas de *C. flavolineatus* e *C. laevicollis*, ou simplesmente ocorre uma ausência de conservatividade dessa estratégia reprodutiva no gênero *Chironius*, ao contrário do que acontece no gênero *Bothrops*, por exemplo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS et al., 2014; SILVA et al., 2020).

O período de cópula observado em *C. bicarinatus* tem início durante o verão (fevereiro), período em que os machos estão no pico da espermiogênese (espermição), indicando um padrão reprodutivo associado (CREWS, 1984). Neste mesmo período, as fêmeas estão em fase inicial da vitelogênese e a ovulação deve ocorrer apenas na primavera, caracterizando um padrão reprodutivo dissociado e resultando na estocagem de espermatozoides obrigatória nos ovidutos (SAINT GIRONS, 1982; CREWS, 1984).

O desencadeamento de eventos reprodutivos por meio da queda de temperatura e níveis de umidade, tem sido relatado por alguns autores para espécies tropicais e neotropicais (SOLÓRZANO, 2004; SOUZA, 2020). Em *C. bicarinatus*, a queda na temperatura e baixos níveis de precipitação aparentam ser favoráveis para o início da vitelogênese em fêmeas e do ciclo da gametogênese em machos (outono e inverno, respectivamente), bem como o período de acasalamento, o qual tem sua concentração durante essas estações.

Em *C. flavolineatus* a fase de recrudescência testicular foi observada apenas no outono (final de março e maio). A espermiogênese tem início no inverno e se estende durante a primavera e o verão do ano seguinte e parece ser homogênea entre as estações. O estágio de regressão testicular ocorre em duas estações distintas: inverno e verão, e isso pode estar relacionado ao baixo *n* amostral. A estocagem no ducto deferente ocorre ao longo de todo ano, sugerindo, também para esta espécie, que os machos estariam prontos para acasalar a qualquer momento. Esse resultado corrobora com o proposto por Pinto et al. (2010), analisando o volume testicular e o diâmetro do ducto deferente macroscopicamente, entretanto, foi confirmado no presente estudo com as análises histológicas. A hipertrofia do SSR foi observada ao longo de

todo ano e de forma relativamente homogênea entre as estações. Durante a primavera os machos apresentam-se em fase de espermiogênese, com o SSR hipertrofiado e com secreção no lúmen, bem como estocando espermatozoides nos ductos deferentes, corroborando com o evento observado de corte/agregação nesta espécie (FEIO et al., 1999), bem como os indícios de cópula do presente estudo. É possível que a diferença sazonal não observada nas medidas microscópicas analisadas, esteja associada ao *n* amostral.

Nas fêmeas de *C. flavolineatus*, a pré vitelogênese foi observada durante o verão e outono. A vitelogênese inicial ocorre principalmente no outono e primavera, e pontualmente no verão e inverno. A vitelogênese intermediária/avançada foi encontrada durante a primavera e verão, e pontualmente em julho. A prenhez ocorre entre dezembro e fevereiro. Esses dados são parcialmente similares aos encontrados por Pinto et al. (2010), uma vez que fêmeas em vitelogênese avançada foram encontradas a partir do final de agosto e se estendem até fevereiro, e fêmeas ovígeras foram encontradas no mesmo período. O nascimento dos filhotes foi observado principalmente no outono e inverno. A estocagem de espermatozoides foi observada em todas as estações do ano, porém em uma proporção maior durante a primavera e verão (76,92%), coincidindo com as fêmeas em vitelogênese intermediária/avançada e o período de corte/agregação e acasalamento (este estudo; FEIO et al., 1999; PINTO et al., 2010). A razão de não ter sido observada diferença sazonal entre as medidas microscópicas das fêmeas também pode estar relacionada ao *n* amostral relativamente baixo.

Para *C. flavolineatus*, a cópula tem início durante o inverno (agosto), mesmo período em que os machos estão em máxima atividade testicular (espermição); as fêmeas estão em vitelogênese avançada e a ovulação deve ocorrer no final de agosto (ver PINTO et al., 2010). Esses resultados caracterizam um padrão reprodutivo associado para machos e fêmeas (SAINT GIRONS, 1982; CREWS, 1984). Assim como observado em *C. bicarinatus*, o início do ciclo da espermatogênese dos machos de *C. flavolineatus* (outono), bem como início do período de acasalamento (inverno), parecem sofrer influências de baixos níveis de temperatura e umidade.

Os eventos reprodutivos observados em machos de *C. laevicollis* apresentaram-se, em sua maioria, concentrados em duas estações distintas. A recrudescência é observada durante o verão e inverno. Uma possível explicação para o surgimento da recrudescência em dois momentos, é a ocorrência de cópula também em dois períodos do ano (ALDRIDGE; DUVALL, 2002), que foi observada durante o outono e primavera (este estudo; ARAÚJO et al., 2022b). O estágio de espermiogênese ocorre durante o outono, inverno e primavera, mas é possível que também seja estendido ao longo de todas as estações do ano, como observado nas outras espécies aqui estudadas. A fase de regressão testicular também foi observada em dois períodos

do ano: outono e primavera, corroborando com o fato desta espécie adotar duas estações distintas de acasalamento. Assim como nas demais espécies estudadas, a estocagem de espermatozoides também foi observada ao longo de todo o ano, porém foi observada de maneira mais concentrada no outono ($n = 7$) e primavera ($n = 9$), com 67% dos exemplares analisados. O SSR apresentou-se hipertrofiado ao longo de todas as estações do ano, também de forma homogênea. Além dos registros de cópula coincidirem com os eventos do ciclo reprodutivo dos machos, esses resultados também corroboram com os registros de combate para a espécie (ALMEIDA-SANTOS et al., *in prep.*). Assim como proposto para *C. flavolineatus*, o n amostral de exemplares de *C. laevicollis* parece influenciar na ausência de variação sazonal das medidas microscópicas.

Assim como observado nos machos, as fêmeas de *C. laevicollis* também apresentam alguns eventos reprodutivos concentrados em duas estações distintas do ano. A pré-vitelogênese foi observada pontualmente em três meses: fevereiro, maio e dezembro. A vitelogênese inicial ocorre entre janeiro-março e em setembro e outubro. As fases de vitelogênese intermediária/avançada foram observadas durante todos os meses do ano, mas estão mais concentradas durante a primavera e verão (66%). Fêmeas ovígeras são encontradas na primavera e outono e o recrutamento de filhotes foi observado em janeiro, fevereiro e entre maio e agosto. A ovipostura foi registrada na primavera e verão, e está de acordo com observações prévias (RIBEIRO DA COSTA et al., 2005). Esses dados corroboram com o que foi observado por Ribeiro da Costa et al. (2005), e adicionalmente o mês de março. Dessa forma, o nascimento de filhotes deve ocorrer entre janeiro e agosto. A estocagem de espermatozoides foi observada pontualmente em todas as estações do ano e de certa forma coincide com algumas cópulas evidenciadas no presente estudo.

A época de acasalamento em *C. laevicollis* é observada em dois momentos, durante o início da primavera (setembro) e no outono (maio). Em ambos os períodos, os machos apresentam pico de atividade testicular (espermição), caracterizando um padrão reprodutivo associado ao acasalamento (CREWS, 1984). Para as fêmeas, o padrão reprodutivo sugerido é dissociado, uma vez que folículos em vitelogênese avançada (> 30 mm) foram encontrados entre novembro e fevereiro (provavelmente, mesmo período de ovulação), não coincidindo com ambos os períodos de cópula, indicando a obrigatoriedade da estocagem de espermatozoides nos ovidutos até a ovulação (SAINT GIRONS, 1982; CREWS, 1984).

Sugere-se, para os machos de *Chironius* examinados no presente estudo, o padrão reprodutivo contínuo cíclico em nível individual, devido ao fato de não ter sido observado estágio de quiescência testicular nos exemplares analisados, mas sim uma redução da atividade

gonadal durante alguns períodos do ano. A nível populacional, os machos adotam o padrão reprodutivo sazonal semi-sincrônico, uma vez que diversos estágios da espermiogênese foram encontrados em uma mesma época do ano, isto é, não ocorrem de forma marcadamente sincrônica entre os indivíduos da população, mas ainda assim é possível evidenciar que alguns eventos do processo reprodutivo estão concentrados em uma determinada época do ano (MATHIES, 2011). O padrão reprodutivo contínuo cíclico em machos têm sido descrito para serpentes tropicais e neotropicais (GORMAN et al., 1981; PIZZATTO; MARQUES, 2006; PIZZATTO et al., 2008; MATHIES et al., 2010; PINTO et al., 2010). Para os machos das três espécies, foi observado a ampola do ducto deferente, porção mais distal do ducto caracterizado por sofrer um aumento significativo no diâmetro e alterações no epitélio, formando invaginações irregulares (TRAUTH; SEVER, 2016). Essa estrutura tem sido observada em serpentes, principalmente colubrídeos, e pode, ou não, apresentar atividade secretora (SEVER, 2004; SIEGEL et al., 2009; ROJAS et al., 2013; BARROS et al., 2014; TRAUTH; SEVER, 2016).

Para as fêmeas de *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus* analisadas no presente estudo, é proposto que o padrão reprodutivo adotado é descontínuo cíclico, uma vez que foi observada quiescência dos ovários e/ou órgãos acessórios (oviduto) durante alguma época do ano. Já para *C. laevicollis*, é sugerido que o padrão reprodutivo adotado é contínuo cíclico, devido ao fato de não ter sido observada quiescência ovariana durante algum período do ano, ou seja, fêmeas em vitelogênese intermediária/avançada foram encontradas ao longo de todos os meses do ano. Em nível populacional, as fêmeas das três espécies possuem o mesmo padrão reprodutivo que os machos: sazonal semi-sincrônico, isso porque em um mesmo período do ano são encontradas fêmeas em diversos estágios reprodutivos (MATHIES, 2011). Ciclos reprodutivos descontínuos, também têm sido observados em fêmeas da família Colubridae e Dipsadidae (MUNIZ-DA-SILVA, 2012; LOEBENS et al., 2018; 2020; 2022). O padrão reprodutivo contínuo cíclico, para as fêmeas, já foi descrito para algumas espécies de colubrídeos (e.g. *Erythrolamprus miliaris* e *Oxyrhopus guibei*, PIZZATTO; MARQUES, 2002; 2006) mas ainda é pouco documentado (MATHIES, 2011).

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que o fator filogenético influencia o ciclo reprodutivo das fêmeas, uma vez que *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus* são grupos irmãos (DIXON et al., 1993; HOLLIS, 2006; PYRON et al., 2013) e possuem o padrão reprodutivo descontínuo cíclico. Da mesma maneira, a proximidade filogenética entre *C. laevicollis* e *C. scurrulus* (DIXON et al., 1993; HOLLIS, 2006; PYRON et al., 2013), espécie amazônica, parece explicar o padrão reprodutivo contínuo cíclico adotado pelas fêmeas.

As fêmeas de *Chironius* possuem potencial para adotar o padrão reprodutivo contínuo cíclico, devido ao fato de fêmeas ovígeras terem sido encontradas com folículos vitelogênicos simultaneamente, indicando uma produção de múltiplas ninhadas no mesmo ano (MATHIES, 2011). Para *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus*, a proporção de fêmeas ovígeras e com folículos vitelogênicos (apenas em fase inicial) foi de 3,89% e 7,69%, respectivamente. Pinto et al (2010) também encontrou uma fêmea de *C. flavolineatus* ovígera e com folículos em fase inicial da vitelogênese simultaneamente, e a proporção foi de 1,47%. Esses valores inferem uma proporção relativamente baixa, mas importante de ser mencionada. No caso de *C. laevicollis*, a proporção de fêmeas ovígeras e com folículos vitelogênicos (1 em cada fase) foi de 14,28%, quase quatro vezes mais que o observado para *C. bicarinatus*. Essa diferença pode estar relacionado a amostragem de fêmeas adultas para *C. laevicollis*, já que a quantidade de fêmeas ovígeras e com folículos em V2 foi igual para ambas as espécies (3). Entretanto, pode ser que *C. laevicollis* realmente tenha maior potencial para produzir ninhadas múltiplas no mesmo ano, uma vez que é a uma espécie de hábitos terrestres, as fêmeas possuem maior tamanho e robustez do corpo, quando comparada as demais congêneres, o que pode permitir uma maior flexibilidade e espaço na cavidade celomática para carregar ovos e folículos em vitelogênese intermediária/avançada simultaneamente (RODRIGUES, 2007; BANCİ et al., 2022). Além disso, fêmeas estão em vitelogênese intermediária/avançada em praticamente todos os meses do ano, os eventos do ciclo reprodutivo dos machos (recrudescência e regressão testicular) surgem em dois momentos distintos, bem como o período de cópula e fêmeas ovígeras, sugerindo que após a ovipostura, as fêmeas finalizam o processo da vitelogênese em uma estação e ficam ovígeras na estação seguinte. Essa hipótese pode ser corroborada com a observação de espermatozoides estocados no infundíbulo posterior de uma das fêmeas ovígeras e com folículo em vitelogênese intermediária de 12,98 mm. Fêmeas de *Chironius* com potencial de produção de ninhadas múltiplas, já foram observadas em estudos anteriores para *C. quadricarinatus*, com proporção de 3,5% (PINTO et al., 2010), e para *C. carinatus* e *C. grandisquamis* da Costa Rica (GOLDBERG; WHITTIER, 2007), porém não foi mencionado as medidas dos maiores folículos para cálculo da proporção e uma melhor comparação. Entretanto, existe a necessidade de um estudo mais aprofundado acerca do ciclo reprodutivo das fêmeas de *C. laevicollis*, para de fato confirmar se o padrão reprodutivo adotado é contínuo cíclico ou se o que foi observado no presente estudo teve alguma influência de populações distintas em uma única amostra, ou quaisquer outros fatores.

De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com sugestões feitas em estudos prévios com as mesmas espécies e/ou outros congêneres (DIXON et al., 1993;

MARQUES, 1998; RIBEIRO DA COSTA et al., 2005; GOLDBERG; WHITTIER, 2007; MARQUES et al., 2009; PINTO et al., 2010), embora a maioria tenha sido baseado apenas em dados macroscópicos (e.g. tamanho dos folículos ovarianos, variação sazonal do volume testicular e diâmetro dos ductos deferentes). Portanto, as informações alcançadas aqui, por meio de análises histológicas, contribuíram para a determinação da sazonalidade reprodutiva dos machos e fêmeas de *C. bicarinatus*, *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* de forma fidedigna, bem como a descoberta de táticas reprodutivas adotadas pelas espécies (e.g. estocagem de espermatozoides e formação da UMC) (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

A diferença observada no padrão de atividade dos machos de *C. flavolineatus*, provavelmente está relacionada à recrudescência que ocorre no primeiro período de queda da temperatura e dos níveis de precipitação (outono). Os machos voltam a ficar mais ativos quando entram no estágio de espermiogênese e período de cópula (inverno). Embora outros fatores ecológicos possam influenciar a distribuição dos animais. Para *C. bicarinatus* e *C. laevicollis*, não foi observada variação sazonal significativa no padrão de atividade de machos e fêmeas.

Machos se tornam sexualmente maduros com comprimento menor que as fêmeas nas três espécies estudadas. Entretanto, quando relacionado ao CRC médio dos adultos, machos e fêmeas de *C. flavolineatus* e *C. laevicollis* atingem a maturidade sexual com tamanhos similares, enquanto *C. bicarinatus*, as fêmeas maduram sexualmente com comprimento relativamente maior que os machos.

Fêmeas sexualmente maduras de *C. flavolineatus* são maiores que os machos e o SSD é direcionado para as fêmeas. Esses dados corroboram com o sistema de acasalamento que a espécie exibe (agregação entre os indivíduos). Em *C. bicarinatus* não existe diferença estatística entre o tamanho corporal dos sexos e o SSD é direcionado para os machos. Essas informações também reforçam o sistema de acasalamento que é descrito para a espécie (combate entre machos). A exceção foi *C. laevicollis*, na qual as fêmeas sexualmente maduras são maiores que os machos coespecíficos e o SSD também é direcionado para as fêmeas, entretanto, o sistema de acasalamento adotado pela espécie é o combate entre machos.

Chironius laevicollis possui uma ninhada maior quando comparada à *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus* e isso está relacionado ao tamanho materno, uma vez que *C. laevicollis* é a espécie que apresentam maior tamanho, ao contrário de *C. flavolineatus*, embora essa relação (tamanho da ninhada *versus* tamanho materno) não tenha sido estatisticamente comprovada.

Nas três espécies estudadas, machos apresentam o ciclo reprodutivo contínuo e sazonal semi-sincrônico, uma vez que não foram observados indivíduos em quiescência testicular e os estágios da espermatogênese são encontrados em mais de uma estação do ano (ou todas), porém em proporções distintas. A estocagem de espermatozoides é observada ao longo do ano nas três espécies, bem como a hipertrofia do SSR, sugerindo que o acasalamento pode ocorrer em qualquer período, desde que fêmeas estejam receptivas. Além disso, os machos apresentam o padrão reprodutivo associado, uma vez que o pico de atividade testicular coincide com o período de cópula.

Para as fêmeas de *C. bicarinatus* e *C. flavolineatus*, o padrão reprodutivo adotado é descontínuo cíclico, uma vez que foi observada quiescência dos ovários e/ou órgãos acessórios

durante alguma época do ano. Já para *C. laevicollis*, é sugerido que o padrão adotado é contínuo cíclico, devido ao fato de não ter sido observada quiescência ovariana durante algum período do ano. Entretanto, mais estudos são encorajados com *C. laevicollis* para determinar o padrão reprodutivo adotado, a partir de uma maior amostragem. A nível populacional, as fêmeas das três espécies possuem o padrão reprodutivo sazonal semi-sincrônico, isso porque em um mesmo período do ano são encontradas fêmeas em diversos estágios reprodutivos. Para *C. flavolineatus*, a ovulação aparenta ocorrer no mesmo período em que inicia o acasalamento, indicando um padrão reprodutivo associado, assim como os machos coespecíficos. Já para *C. bicarinatus* e *C. laevicollis*, a ovulação ocorre depois que o período de cópula é iniciado, fazendo-se obrigatória a estocagem de espermatozoides nos ovidutos, caracterizando um ciclo dissociado para ambas as espécies.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the Southeastern Crowned Snake (*Tantilla coronata*). **Copeia**, v. 1992, n. 4, p. 1103-1106, 1992.
- ALDRIDGE, R. D.; BROWN, W. S. Male Reproductive Cycle, Age at Maturity, and Cost of Reproduction in the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). **Journal of Herpetology**, v. 29, n. 3, p. 399-407, 1995.
- ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the Mating Season in the Pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v. 16, n. 1, p. 1, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS S. M.; SAWAYA R. J. *Boa constrictor* (Red-tailed Boa): Reproduction and Mating Aggregation. **Herpetological Review**, v. 53, n. 4, p. 690-691, 2022.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; SUEIRO, L. R.; NOMURA, R. H. C. Reproductive Biology of the Brazilian Lancehead, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae), from the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 12, n. 2, p. 174-181, 2017.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H. B.; SANTOS, L.; SUEIRO, L. R.; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; KASPEROVICZUS, K. N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, p. 14-24, 2014.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Male-male ritual combat in the colubrid snake *Chironius bicarinatus* from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, n. 4, p. 528-533, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PENETI, E. A.; DA GRAÇA SALOMÃO, M.; GUIMARÃES, E. S.; DE SENA, P. S. Predatory combat and tail wrestling in hierarchical contests of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, p. 88-96, 1999.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in Neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers**, v. 1, p. 445-462, 2002.

ARAÚJO, G. S.; RAMALHO, R. A.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. First record of male-male combat and courtship in the brown vine snake *Oxybelis aeneus*. **Herpetological Bulletin**, v. 162, p. 45-46, 2022a.

ARAÚJO, G. S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MIGLIORE, S. N.; LOBO, L. M. *Chironius laevicollis* (Brazilian Sipo): Mating behavior. **Herpetological Review**, v. 53, n. 2, p. 335-336, 2022b.

BANCI, K. R. D. S.; GUIMARÃES, M.; SIQUEIRA, L. H. C.; MUSCAT, E.; SAZIMA, I.; MARQUES, O. A. V. Body shape and diet reflect arboreality degree of five congeneric snakes sympatric in the Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 54, n. 4, p. 839-851, 2022.

BANCI, K. R. S.; BATISTA, S. F.; MARQUES, O. A. V. *Philodryas Olfersii* (Lichtenstein's Green Racer): Reproductive Aggregation. **Herpetological Review**, v. 52, n. 4, p. 881, 2021.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **The Herpetological Journal**, v. 24, n. 2, p. 69-77, 2014.

BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **The Herpetological Journal**, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2012.

BATISTA, S.; MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Dominant and submissive behaviour in the rattlesnake *Crotalus durissus* under semi-natural conditions. **Herpetological Bulletin**, v. 157, p. 21-24, 2021.

BELLINI, G. P.; ARZAMENDIA, V.; GIRAUDO, A. R. Reproductive life history of snakes in temperate regions: what are the differences between oviparous and viviparous species? **Amphibia-Reptilia**, v. 40, n. 3, p. 291-303, 2018.

BISHOP, J. E. A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. **Journal of Morphology**, v. 104, n. 2, p. 307-357, 1959.

BLACKBURN, D. G. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, n. 4-5, p. 560-617, 1998.

BLANCKENHORN, W. U. Behavioral causes and consequences of sexual size dimorphism. **Ethology**, v. 111, n. 11, p. 977-1016, 2005.

BLOUIN-DEMERS, G.; GIBBS, H. L.; WEATHERHEAD, P. J. Genetic evidence for sexual selection in black ratsnakes, *Elaphe obsoleta*. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 1, p. 225-234, 2005.

BONNET, X.; SHINE, R.; NAULLEAU, G.; VACHER-VALLAS, M. Sexual dimorphism in snakes: different reproductive roles favour different body plans. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1392, p. 179-183, 1998.

BRAZ, H. B.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MURPHY, C. R.; THOMPSON, M. B. Uterine and eggshell modifications associated with the evolution of viviparity in South American water snakes (*Helicops* spp.). **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, [s. l.], v. 330, n. 3, p. 165-180, 2018.

BROWN, G. P.; SHINE, R. Beyond size–number trade-offs: clutch size as a maternal effect. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1520, p. 1097-1106, 2009.

CAPULA, M.; LUISELLI, L. A tentative review of sexual behaviour and alternative reproductive strategies of the Italian colubrid snakes (Squamata: Serpentes: Colubridae). **Herpetozoa**, v. 10, p. 107-119, 1997.

CARPENTER, C. C. Communication and Displays of Snakes. **Oxford Journals**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 217-223, 1977.

COSTA, H. C.; GUEDES, T.; BÉRNILS, R. S. (eds.) Lista Brasileira de Répteis, 2023. **Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH)**. <https://sbherpetologia.org.br/lista-repteis-sbh-copy-copy>, acessada em 19 de Maio de 2023.

COUTO, R. M. P.; MIGUEL, M. C.; QUIROGA, C. L.; FERREIRA, V. L. Mating mode observation for *Hydrodynastes gigas* (Squamata, Dipsadidae) in Argentina. **Herpetology Notes**, v. 15, p. 101-104, 2022.

CREWS, D. Gamete production, sex hormone secretion, and mating behavior uncoupled. **Hormones and behavior**, v. 18, n. 1, p. 22-28, 1984.

CREWS, D.; GARSTKA, W. R. The ecological physiology of a garter snake. **Scientific American**, v. 247, n. 5, p. 158-171, 1982

DA FONSECA, W. L.; CORREA, R. R.; DE SOUZA OLIVEIRA, A.; BRAZ, H. B.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BERNARDE, P. S. First report of male–male combat in free-ranging Amazonian Common Lanceheads (*Bothrops atrox*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 100, n. 3, p. 239-242, 2022.

DE SOUZA, E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproduction in the bushmaster (*Lachesis muta*): uterine muscular coiling and female sperm storage. **Acta Zoologica**, v. 103, n. 2, p. 244-255, 2022.

DEL-CLARO, K.; PREZOTO, F.; SABINO J. **Comportamento animal: As distintas faces do comportamento animal**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia/Editora e Livraria Conceito, v. 1, p. 10-13, 2004.

DENARDO, D. F.; TAYLOR, E. N. Hormones and Reproduction in Free-ranging snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Eds.), **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**, CRC Press, p. 265–287, 2011.

DIXON, J. R.; WIEST, J. A.; CEI, J. M. Revision of the Neotropical snake genus *Chironius* Fitzinger (Serpentes, Colubridae). **Monografie dei Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino**, v. 13, p. 279, 1993.

DUVALL, D.; ARNOLD, S. J.; SCHUETT, G. W. Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection, and microevolution. **Biology of the Pitvipers**, p. 321-336, 1992.

DUVALL, D.; SCHUETT, G. W. Straight-line movement and competitive mate searching in prairie rattlesnakes, *Crotalus viridis viridis*. **Animal Behaviour**, v. 54, n. 2, p. 329-334, 1997.

DUVALL, D.; SCHUETT, G. W.; ARNOLD, S. J. Ecology and evolution of mating systems. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T. (Eds.). **Snakes: Ecology and behavior**. New York: McGraw-Hill, p. 165-200, 1993.

EMLEN, S. T.; ORING, L. W. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. **Science**, v. 197, n. 4300, p. 215-223, 1977.

FEIO, R.; SANTOS, P. S.; FERNANDES, R.; DE FREITAS, T. S. *Chironius flavolineatus*: Courtship. **Herpetological Review**, v. 30, p. 99, 1999.

FERNANDES, D. S.; HAMDAN, B. A new species of *Chironius* Fitzinger, 1826 from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Serpentes: Colubridae). **Zootaxa**, v. 3881, n. 6, p. 563-575, 2014.

FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das serpentes (Squamata): II. Família Colubridae. In: **Herpetologia do Brasil**, p. 81-91, 1994.

FITCH, H. S. Reproductive cycles of lizards and snakes. University of Kansas, Museum of Natural History, **Miscellaneous Publication**, v. 52, p. 1-247, 1970.

FOWLER, I. R.; SALOMÃO, M. G. A study of sexual dimorphism in six species from the genus *Philodryas*. **The snake**, v. 26, p. 117-122, 1994.

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. **Biology of the Reptilia**. New York: Academy press, v. 6, p. 1-157, 1977.

FOX, W. Seminal receptacles of snakes. **The Anatomical Record**, v. 124, n. 3, p. 519-539, 1956.

GARSTKA, W. R.; CREWS, D. Female sex pheromone in the skin and circulation of a garter snake. **Science**, v. 214, p. 681-683, 1981.

GIBBONS, J. W.; SELMLITSCH, R. D. Activity patterns. In: **Snakes, Ecology and Evolutionary Biology**. SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T; NOVAK, S. S. (Eds.). New York, McMillan Publishing Company, p. 396-421, 1987.

GILLINGHAM, J. C. Social behavior. In: **Snakes, Ecology and Evolutionary Biology**. SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T; NOVAK, S. S. (Eds.). New York: McGraw-Hill, p. 184-209, 1987.

- GIRLING, J. E. The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 2, p. 141-170, 2002.
- GOODYEAR, J.; GILBERT, E. First record of male-male combat in *Xenopeltis unicolor*. **Herpetological Bulletin**, v. 143, p. 45-56, 2018.
- GOLDBERG, S. R.; PARKER, W. S. Seasonal Testicular Histology of the Colubrid Snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. **Herpetologica**, v. 31, n. 3, p. 317-322, 1975.
- GOLDBERG, S. R.; WHITTIER, C. A. Note on Reproduction of Whipsnakes, Genus *Chironius* (Serpentes: Colubridae), from Costa Rica. **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, v. 42, p. 148-149, 2007.
- GORMAN, G. C.; LICHT, P; MCCOLLUM, F. Annual reproductive patterns in three species of marine snakes from the central Phillippines. **Journal of Herpetology**, p. 335-354, 1981.
- GRIBBINS, K. M.; RHEUBERT, J. L. The ophidian testis, spermatogenesis, and mature spermatozoa. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**, v. 9, p. 183-264, 2011.
- GRIBBINS, K. Reptilian spermatogenesis: a histological and ultrastructural perspective. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 3, p. 250-269, 2011.
- GUEDES, T.; GUEDES, A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Male-male fighting, dominance, and mating in *Epicrates assisi* (Serpentes: Boidae) in captivity. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 18, n. 1, p. 131-135, 2019.
- HAMDAN, B.; FERNANDES, D. S. Taxonomic revision of *Chironius flavolineatus* (Jan, 1863) with description of a new species (Serpentes: Colubridae). **Zootaxa**, v. 4012, n. 1, p. 97-119, 2015.
- HOLLIS, J. L. Phylogenetics of the genus *Chironius* Fitzinger, 1826 (Serpentes, Colubridae) based on morphology. **Herpetologica**, v. 62, n. 4, p. 435-453, 2006.
- JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KARL, S. A. The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 3973-3977, 2008.

- KHOURI, R. S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; FERNANDES, D. S. Anatomy of the reproductive system of a population of *Amerotyphlops brongersmianus* from southeastern Brazil (Serpentes: Scolecophidia). **The Anatomical Record**, v. 303, n. 9, p. 2485-2496, 2020.
- KOK, P. J. R. A new species of *Chironius* Fitzinger, 1826 (Squamata: Colubridae) from the Pantepui region, northeastern South America. **Zootaxa**, v. 2611, n. 1, p. 31-44, 2010.
- KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. (Eds.). **Behavioural ecology: an evolutionary approach**. John Wiley & Sons, 2009.
- KROHMER, R. W. Variation in seasonal ultrastructure of sexual granules in the renal sexual segment of the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon*. **Journal of Morphology**, v. 261, n. 1, p. 70-80, 2004.
- LEITE, P. T.; KAEFER, I. L.; CECHIN, Z. S. Diet of *Philodryas olfersii* (Serpentes, Colubridae) during hydroelectric dam flooding in southern Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 5, n. 1, 2009.
- LEITE, P. T.; NUNES, S. D. F.; KAEFER, I. L.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of the swamp racer *Mastigodryas bifossatus* (Serpentes: Colubridae) in subtropical Brazil. **Zoologia** (Curitiba), v. 26, p. 12-18, 2009.
- LEMASTER, M. P.; MASON, R. T. Variation in a female sexual attractiveness pheromone controls male mate choice in garter snakes. **Journal of chemical ecology**, v. 28, p. 1269-1285, 2002.
- LOEBENS, L.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in south Brazil: Female reproductive cycle. **Acta Zoologica**, v. 99, n. 2, p. 105-114, 2018.
- LOEBENS, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of the Sword Snake *Tomodon dorsatus* (Serpentes: Dipsadidae) in South Brazil: comparisons within the tribe Tachymenini. **Amphibia-Reptilia**, v. 41, n. 4, p. 445-459, 2020.
- LOEBENS, L.; THEIS, T. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology, sperm storage, and sexual maturity of *Thamnodynastes strigatus* (Serpentes: Dipsadidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, p. e20211087, 2022.

LOVICH, J. E.; GIBBONS, J. W. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. **Growth Development and Aging**, v. 56, p. 269, 1992.

MARQUES, O. A. V. **Composição faunística. História natural e ecologia de serpentes da Mata Atlântica, na região da Estação Ecológica Juréia-Itatins, São Paulo, SP**. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, p.142. 1998.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M.; CAMARGO, R. Mating and reproductive cycle in the Neotropical colubrid snake *Chironius bicarinatus*. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, n. 4, p. 76-80, 2009.

MARQUES, O. A. V.; MURIEL, A. P. Reproductive biology and food habits of the swamp racer *Mastigodryas bifossatus* from southeastern South America. **The Herpetological Journal**, v. 17, n. 2, p. 104-109, 2007.

MARQUES, O. A. V.; PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive strategies of new world coral snakes, genus *Micrurus*. **Herpetologica**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2013.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins. In: MARQUES, O. A. V.; DULEBA, W. (Eds). **Estação Ecológica Juréia-Itatins: Ambiente Físico, Flora e Fauna**. Editora Holos. Ribeirão Preto, p. 257-277, 2004.

MARQUES, R.; MEBERT, K.; FONSECA, É.; RÖDDER, D.; SOLÉ, M.; TINÔCO, M. S. Composition and natural history notes of the coastal snake assemblage from Northern Bahia, Brazil. **ZooKeys**, n. 611, p. 93, 2016.

MARTINS, M.; ARAÚJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). **Journal of Zoology**, v. 254, p. 529-538, 2001.

MASON, R. T.; PARKER, M. R. Social behavior and pheromonal communication in reptiles. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 196, p. 729-749, 2010.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, v. 1, p. 511-550, 2011.

MATHIES, T.; CRUZ, J. A.; LANCE, V. A.; SAVIDGE, J. A. Reproductive biology of male brown treesnakes (*Boiga irregularis*) on Guam. **Journal of Herpetology**, v. 44, n. 2, p. 209-221, 2010.

MEAD, R. A.; EROSCHENKO, V. P.; HIGHFILL, D. R. Effects of progesterone and estrogen on the histology of the oviduct of the garter snake, *Thamnophis elegans*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 45, n. 3, p. 345-354, 1981.

MELO, G. C.; NASCIMENTO, L. B.; GALDINO, C. A. B. Lizard reproductive biology beyond the gonads: an investigation of sperm storage structures and renal sexual segments. **Zoology**, v. 135, p. 125690, 2019.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. **Climatologia: Noções básicas e climas do Brasil**. São Paulo: Oficina de Textos, cap. 7, p. 83-112, 2007

MESQUITA, P. C. M. D.; BORGES-NOJOSA, D. M.; BEZERRA, C. H. Dimorfismo sexual na “cobra-cipó” *Oxybelis aeneus* (Serpentes, Colubridae) no Estado do Ceará, Brasil. **Biotemas**, v 23, p. 65-69, 2010.

MISSASSI, A. F.; COETI, R. Z.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PRUDENTE, A. L. Intense male-male ritual combat in the *Micrurus ibiboboca* complex (Elapidae) from northeastern South America. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 17, n. 1, p. 204-216, 2022.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Reprodução em crotalíneos: Uterine Muscular Twisting *in vivo***. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, São Paulo, p. 75, 2016.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 135. 2012.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Male-male ritual combat in *Spilotes pullatus* (Serpentes: Colubrinae). **Herpetological Bulletin**, v. 126, p. 25-29, 2014.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; PASSOS, J.; SIEGEL, D. S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Caudal oviduct coiling in a viperid snake, *Crotalus durissus*. **Acta Zoologica**, v. 101, n. 1, p. 69-77, 2018.

NASCIMENTO, L. P.; SIQUEIRA, D. M.; SANTOS-COSTA, M. C. Diet, reproduction, and sexual dimorphism in the vine snake, *Chironius fuscus* (Serpentes: Colubridae), from Brazilian Amazonia. **South American Journal of Herpetology**, v. 8, n. 3, p. 168-174, 2013.

NOGUEIRA, C. C.; ARGÔLO, A. J.; ARZAMENDIA, V.; AZEVEDO, J. A.; BARBO, F. E.; BÉRNILS, R. S.; BOLOCHIO, B. E.; BORGES-MARTINS, M.; BRASIL-GODINHO, M.; BRAZ, H. B.; BUONONATO, M. A.; CISNEROS-HEREDIA, D. F.; COLLI, G. R.; COSTA, H. C.; FRANCO, F. L.; GIRAUDO, A.; GONZALEZ, R. C.; GUEDES, T.; HOOGMOED, M. S.; MARQUES, O. A.V.; MONTINGELLI, G. G.; PASSOS, P.; PRUDENTE, A. L.C.; RIVAS, G. A.; SANCHEZ, P. M.; SERRANO, F. C.; SILVA, N. J.; STRÜSSMANN, C.; VIEIRA-ALENCAR, J. P. S.; ZAHER, H.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Atlas of Brazilian snakes: verified point-locality maps to mitigate the Wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. **South American Journal of Herpetology**, v. 14, p. 1-274, 2019.

O'DONNELL, R. P.; FORD, N. B.; SHINE, R.; MASON, R. T. Male red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*, determine female mating status from pheromone trails. **Animal Behaviour**, v. 68, n. 4, p. 677-683, 2004.

OLIVEIRA, J. L. **Ecologia de três espécies de dormideira, *Sibynomorphus* (Serpentes: Colubridae)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 60, 2001.

OLIVEIRA, S. V. Observação do comportamento predatório de *Chironius bicarinatus* (Serpentes, Colubridae) em *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae), Serra do sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, v. 6, n. 2, 2008.

PERKINS, J. M.; PALMER, B. D. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. **Journal of Morphology**, v. 227, p. 67–79, 1996.

PINTO, R. R.; FERNANDES, R.; MARQUES, O. A. V. Morphology and diet of two sympatric colubrid snakes, *Chironius flavolineatus* and *Chironius quadricarinatus* (Serpentes: Colubridae). **Amphibia-Reptilia**, v. 29, n. 2, p. 149-160, 2008.

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

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia Reprodutiva de Serpentes Brasileiras L. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. (Eds). **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, p. 201-221, 2007.

PIZZATTO, L.; JORDÃO, R. S.; MARQUES, O. A. V. Overview of reproductive strategies in *Xenodontini* (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) with new data for *Xenodon neuwiedii* and *Waglerophis merremii*. **Journal of Herpetology**, v. 42, n. 1, p. 153-162, 2008.

PIZZATTO, L.; MANFIO, R. H.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Male-male ritualized combat in the Brazilian rainbow boa, *Epicrates cenchria crassus*. **Herpetological Bulletin**, v. 95, p. 16, 2006.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. **The Herpetological Journal**, v. 16, n. 4, p. 353-362, 2006.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) from southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 495-504, 2002.

PROSSER, M. R.; WEATHERHEAD, P. J.; GIBBS, H. L.; BROWN, G. P. Genetic analysis of the mating system and opportunity for sexual selection in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). **Behavioral Ecology**, v. 13, n. 6, p. 800-807, 2002.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 1-54, 2013.

RIBEIRO DA COSTA, A. C. O.; HAUZMAN, E.; SCARTOZZONI, R. R. *Chironius laevicollis* (Pale-necked whipsnake): Reproduction. **Herpetological bulletin**, n. 92, p. 26-27, 2005.

RIVAS, J. A.; BURGHARDT, G. M. Snake mating systems, behavior, and evolution: the revisionary implications of recent findings. **Journal of Comparative Psychology**, v. 119, n. 4, p. 447, 2005.

RIVAS, J. A.; BURGHARDT, G. M. Understanding sexual size dimorphism in snakes: wearing the snake's shoes. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 3, p. 1-6, 2001.

ROBERTO, I. J.; SOUZA, A. R. Review of prey items recorded for snakes of the genus *Chironius* (Squamata, Colubridae), including the first record of *Osteocephalus* as prey. **Herpetology Notes**, v. 13, p. 1-5, 2020.

RODRIGUES, M. G. **Ecomorfologia e uso de recursos das espécies de *Chironius* (Serpentes, Colubridae) na Serra do Mar**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, p. 75, 2007.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. **Zoomorphology**, v. 134, p. 577-586, 2015.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. **Journal of Morphology**, v. 274, n. 2, p. 215-228, 2013.

RUBENSTEIN, D. R.; ALCOCK, J. **Animal behavior: an evolutionary approach**. Eleventh Edition. Manhattan, New York, USA. Oxford University Press, 2019.

SAINT GIRONS, H. Morphologie comparée du segment sexuel du rein des squamates (Reptilia). **Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale**, v. 61, p. 243-266, 1972.

SAINT GIRONS, H. S. Reproductive cycles of the male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1982.

SANTOS, M. L. S.; NASCIMENTO, P. H.; TAVARES, I. V. N. M.; CORREIA, J. M. S.; DOS SANTOS, E. M. *Corallus hortulana* (Suaçuboia): Male Combat. **Herpetological Review**, v. 51, p. 611-612, 2020.

SCARTOZZONI, R. R.; SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Natural history of the vine snake *Oxybelis fulgidus* (Serpentes, Colubridae) from Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 81-89, 2009.

SCHUETT, G. W.; CARLISLE, S. L.; HOLYCROSS, A. T.; O'LEILE, J. K.; HARDY, D. L.; VAN KIRK, E. A; MURDOCH, W. J. Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*):

Seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds.), **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain, Carmel, p. 515-532, 2002.

SETER, P. J. Phylogeny of Courtship and Male-male Combat Behavior in Snakes: An Updated Analysis. **Current Herpetology**, v. 41, n. 1, p. 35-81, 2022.

SHERIDAN, M. A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 495-508, 1994.

SHINE, R. Activity patterns in Australian elapid snakes (Squamata: Serpentes: Elapidae). **Herpetologica**, v 35, p. 1–11, 1979.

SHINE, R. “Costs” of Reproduction in Reptiles. **Oecologia**, v. 46, n. 1980, p. 92-100, 1980.

SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes I. Testicular cycles and mating seasons. **Australian Journal of Zoology**, v. 25, n. 4, p. 647-653, 1977.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1519, p. 995-1004, 2003.

SHINE, R. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. **Oecologia**, v. 33, p. 269-278, 1978.

SHINE, R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. **Copeia**, p. 326-346, 1994.

SHINE, R.; BONNET, X. Reproductive biology, population viability, and options for field management. In: MULLIN, S. J.; SEIGEL, R. A. (Eds.). **Snakes – Ecology and Conservation**. Cornell University Press, Ithaca, p. 172-200, 2009.

SHINE, R.; FITZGERALD, M. Variation in mating systems and sexual size dimorphism between populations of the Australian python *Morelia spilota* (Serpentes: Pythonidae). **Oecologia**, p. 490-498, 1995.

SHINE, R.; MASON, R. T. An airborne sex pheromone in snakes. **Biology letters**, v. 8, n. 2, p. 183-185, 2012.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Eds.). **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. New York: MacMillan Publishing Company, 1987.

SEIGEL, R. A.; HUGGINS, M. M.; FORD, N. B. Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes. **Oecologia**, v. 73, p. 481–485, 1987.

SIEGEL, D. S.; MIRALLES, A.; CHABARRIA, R. E.; ALDRIDGE, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Eds). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**, p. 347-409, 2011.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M.; RHEUBERT, J. L.; GRIBBINS, K. M. Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépède (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). **Herpetological Monographs**, v. 23, p. 74-107, 2009.

SILVA, K. M. P. **Biologia reprodutiva de serpentes neotropicais dos grupos *Bothrops atrox* e *Bothrops jararacussu* (Viperidae: Crotalinae)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 127, 2019.

SILVA, K. M. P.; SUEIRO, L. R.; GALASSI, G. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. **Veterinária e Zootecnia** v. 20, p. 632–642, 2013.

SILVA, K. M.; BRAZ, H. B.; KASPEROVICZUS, K. N.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproduction in the pitviper *Bothrops jararacussu*: large females increase their reproductive output while small males increase their potential to mate. **Zoology**, v. 142, p. 125816, 2020.

SIQUEIRA, D. M.; NASCIMENTO, L. P.; MONTINGELLI, G. G.; SANTOS-COSTA, M. C. Geographical variation in the reproduction and sexual dimorphism of the Boddaert's tropical racer, *Mastigodryas boddaerti* (Serpentes: Colubridae). **Zoologia** (Curitiba), v. 30, p. 475-481, 2013.

SOLÓRZANO, A. **Snakes of Costa Rica: Distribution, taxonomy and natural history**. Instituto Nacional de Biodiversidad, (INBio), Costa Rica, 2004.

SOUZA, E. **Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*): de Norte a Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, p. 142, 2020.

SOUZA, E; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproduction in the bushmaster (*Lachesis muta*): uterine muscular coiling and female sperm storage. **Acta Zoologica**, v. 103, n. 2, p. 244-255, 2022.

SUEIRO, L. R. **Custos Reprodutivos em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) do Estado de São Paulo, Brasil**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 104, 2013.

TRAUTH, S. E.; SEVER, D. M. Male urogenital ducts and cloacal anatomy. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Eds). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**, CRC Press, p. 423-488, 2016.

TRENBERTH, K. E. What are the seasons? **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 64, n. 11, p. 1276-1282, 1983.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; REYES, F.; HOŠEK, J. (eds.) **The Reptile Database**, 2023. <http://www.reptile-database.org>, accessed on 19 May 2023.

VOLSØE, H. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus*. **Spolia Zool. Mus. Hauniensis**, v. 5, p. 1-157, 1944.

VRCIBRADIC, D.; EISFELD, A. Predation on a tropical house gecko, *Hemidactylus mabouia* by a juvenile colubrid snake, *Chironius bicarinatus*, in a Brazilian Atlantic Rainforest area. **Cuadernos de Herpetologia**, v. 30, n. 2, p. 75-77, 2016.

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P. F.; ABDALLA, F. M. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General and comparative endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 151-157, 2004.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. ed. Princeton-Hall, New Jersey, P. 663, 1999.

APÊNDICE A – Identificação dos exemplares analisados.

Chironius bicarinatus

Coleção de Anfíbios e Répteis do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) – 10185, 12582, 12664, 13120, 16530, 16897, 17474, 23372, 23571, 24917, 26310, 26340.

Coleção de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora (CHUFJF) – 2161.

Coleção de Répteis do Museu de Biodiversidade do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC) – 51, 52, 555, 753, 925, 1027, 1109, 1346, 1347, 1420, 1499, 1623, 2063, 2341, 2370, 2445, 3598, 3663, 3968, 4092.

Coleção de Répteis do Museu de Biologia “Mello Leitão” do Instituto Nacional da Mata Atlântica (MBML) – 450, 710, 2153, 2159, 2165, 2899, 2998, 3002, 4574, 4590, 4801, 4879.

Coleção de Répteis do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP) – 2499, 3712, 9184, 9729, 10716, 10830, 11165, 17270, 17297, 17452, 19064.

Coleção de Répteis do Museu Zoobotânico Augusto Ruschi da Universidade de Passo Fundo (CRUPF) – 197, 292, 361, 699, 869, 917, 1047, 1144, 1516, 1667.

Coleção Herpetológica “Alphonse Richard Hoge” do Laboratório de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan (IBSPCR/LCZ) – 18761, 18762, 60607, 62019, 62433, 62845, 64690, 65414, 65415, 65423, 66764, 66767, 66994, 66998, 67518, 67987, 68471, 69685, 70528, 70532, 70614, 70958, 71276, 72485, 72745, 72859, 74147, 75310, 78013, 78032, 78033, 78208, 78277, 78384, 78395, 78410, 78417, 78511, 78562, 78679, 79065, 79151, 79155, 79264, 79334, 79402, 79574, 79599, 79665, 81088, 81193, 81213, 81419, 81720, 81852, 81890, 82080, 82134, 82272, 82414, 82415, 82446, 82561, 82650, 82735, 82742, 83156, 83354, 83428, 83550, 83980, 84120, 84448, 84534, 84622, 84828, 84883, 85043, 85234, 85367, 85454, 85567, 85568, 85605, 85774, 85946, 85978, 86185, 86469, 86754, 86827, 86994, 87380, 87412, 87415, 87487, 87502, 87570, 87760, 87938, 88084, 88102, 88103, 88151, 88333, 88566, 88570, 89268, 89311, 89362, 89368, 89409, 89455, 89468, 89477, 89599, 89681, 89692, 89713, 89911, 89974, 90191, 90383, 90526, 90725, 91898, 91899.

Coleção Herpetológica do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI) – 394, 1029, 1878, 1879, 2140, 3440, 4108, 5329, 5330, 6481, 10739, 11852, 12006.

Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia “João Moojen” (MZUFV) – 46, 49, 143, 1731, 2133, 2413.

Chironius flavolineatus

Coleção Científica de Serpentes da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) – 392, 428, 429, 1305, 3722.

Coleção de Anfíbios e Répteis do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) – 588, 3064, 3065, 3981, 6697, 7495, 9274, 10929, 12900, 12901, 14855, 15355, 17271.

Coleção de Herpetologia do Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNR) – 607, 791, 793.

Coleção de Répteis do Museu de Biodiversidade do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC) – 2013, 2470, 2766, 2839.

Coleção de Répteis do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP) – 8568, 1686.

Coleção Herpetológica “Alphonse Richard Hoge” do Laboratório de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan (IBSPCR/LCZ) – 80810, 80935, 83076, 83077, 84820, 87854, 90163, 90430, 91792.

Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Pernambuco (CHUFPE) – 394, 395, 396.

Coleção Herpetológica do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI) – 4446, 4567, 14225, 14604, 14754, 14791, 15536, 15537, 15582, 17030, 17690, 17710, 17746.

Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia “João Moojen” (MZUFV) – 943, 944, 946.

Coleção Zoológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (ZUFMS) – 983, 1376, 1379, 1380, 1589, 1607, 1647, 1673, 1835, 2583, 2584, 2715, 3418, 3641, 3643, 3644, 3645, 3647, 3648, 3650, 3652, 3654.

Chironius laevicollis

Coleção de Anfíbios e Répteis do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) – 452, 7821, 7822, 9016, 11956, 12505, 12862, 13178, 14409, 14806, 19741, 20085, 21538, 23870, 23896, 23898, 23902, 24270, 25012, 26544, 27226, 27573.

Coleção de Répteis do Museu de Biodiversidade do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC) – 1061, 1276, 3905.

Coleção de Répteis do Museu de Biologia “Mello Leitão” do Instituto Nacional da Mata Atlântica (MBML) – 29, 1709, 2139, 3313, 3893.

Coleção Herpetológica “Alphonse Richard Hoge” do Laboratório de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan (IBSPCR/LCZ) – 26738, 45701, 54228, 55630, 72012, 72480, 87017, 88532, 88567, 88568, 88569, 89547, 90762.

Coleção Herpetológica do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI) – 452, 453, 455, 457, 599, 1342, 2222, 3523, 4783, 4862, 5872, 6014, 6542, 7313, 7968, 8057, 9016, 10432, 10794, 11220, 11293, 11320, 11582, 11899, 11956, 12718, 12862, 14060, 15830, 17484.

APÊNDICE B – Fêmeas ovígeras de *C. bicarinatus*.

Voucher	CRC (mm)	Média ± DP	Número e tamanho dos ovos (mm)										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
UFJF 2161	840	53,81 ± 0,94	53,14	54,48									
LECZ 84534	818	31,72 ± 3,74	27,79	28,89	31,31	31,45	32,44	38,49					
ZUEC 4092	823	34,49 ± 2,82	30,67	33,23	33,24	34,66	36,39	38,79					
ZUEC 2370	1145	31,92 ± 4,37	26,95	27,54	29,01	30,41	32,7	33,02	36,09	39,67			
LECZ 78395	845	28,91 ± 2,67	24,9	26,1	27,73	28,23	29,34	30,84	31,94	32,23			
MZUFV 46	866	32,62 ± 2,48	29,77	29,94	30,98	31,7	32,97	33,54	35,79	36,28			
LECZ 86185	835	29,79 ± 3,94	24,56	25,27	27,69	28,68	29,31	29,55	29,85	31,07	33,95	38,02	
LECZ 69685	820	27,38 ± 3,58	21,09	22,12	25,02	26,46	26,76	27,02	28,86	30,56	30,95	31,07	31,33
LECZ 90383 *	920	29,28 ± 4,47	25,58	25,87	30,69	35	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

CRC - comprimento rosto-cloacal

DP - desvio padrão

(*) indica ausência de medidas de alguns ovos

Fonte: Araújo, G. S. 2023