

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Verônica Alberto Barros

**Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da
região neotropical**

São José do Rio Preto

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Verônica Alberto Barros

**Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da
região neotropical**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração - Zoologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

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

São José do Rio Preto

2011

Verônica Alberto Barros

Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical

Banca Examinadora

Titulares

Prof^a. Dr^a. Selma Maria Almeida-Santos (Orientadora) _____

Instituto Butantan – São Paulo/ SP

Prof. Dr. Otavio Augusto Vuolo Marques _____

Instituto Butantan – São Paulo/ SP

Prof. Dr. Márcio Roberto Costa Martins _____

USP – São Paulo/ SP

Suplentes

Prof. Dr. Ricardo Jannini Sawaya _____

UNIFESP – Diadema/ SP

Prof. Dr. Carlos Arturo Navas Iannini _____

USP – São Paulo/ SP

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho às minhas filhas, Manuela e Vitória,
por terem iluminado minha vida ao nascer!

Ao meu marido Silvio, por todo carinho, amor, apoio e
compreensão.

Aos meus pais, Leila e José, por tudo que fizeram e
fazem até hoje para que eu consiga realizar meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus, por abençoar a minha vida com a presença de tantas pessoas queridas. Pelas dificuldades em meu caminho que fazem com que eu me torne uma pessoa melhor.

À minha orientadora, Selma, pela amizade, apoio, incentivo e pelo seu exemplo como pessoa sempre alegre e gentil, e pesquisadora competente. Sou especialmente grata por permitir a minha ausência do laboratório durante os primeiros meses de vida das minhas filhas.

À minha família, sem a qual eu não conseguiria ter chegado até aqui. Ao Silvio, por ajudar em tudo na minha vida, por acreditar em mim e me fazer feliz. Aos meus pais, por todo amor e pelo esforço que fizeram para que eu pudesse ter uma boa educação. Agradeço especialmente à minha mãe Leila, pela ajuda com os cuidados da Vick e Manu durante a fase final da redação desta dissertação. À minha irmã Lilian, por todo apoio e carinho e por ser um exemplo para mim. Às minhas filhas, por terem mudado minha vida para melhor.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan. Sou especialmente grata ao amigo Rodrigo R. Scartozoni pela revisão do meu projeto de mestrado, a Ricardo J. Sawaya pelas críticas sobre o projeto, à Livia C. dos Santos pelo auxílio para fotografar as lâminas microscópicas e à Letícia R. Sueiro pelo auxílio na coleta de dados sobre *Crotalus durissus*. A todos do grupo de estudos em reprodução, pelas discussões sobre o tema. Ao Pedro (Pará) por me ajudar a costurar as serpentes depois da dissecação. Ao Valdir por todo apoio para o trabalho na coleção do Instituto Butantan.

Ao Michel, Fernanda e Rodrigo pelo abrigo em São José do Rio Preto durante as disciplinas.

Ao Otavio A. V. Marques e Carlos Navas pelos comentários durante o exame de qualificação que ajudaram a melhorar o capítulo 1.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, que sempre me ajudaram muito em função da distância.

Ao Argôlo, Juliana, Fátima, Jacques Delabie e demais funcionários e alunos da UESC e CEPLAC por terem me recebido tão bem durante minha estadia na Bahia e por todo apoio com o trabalho nas coleções. Sou especialmente grata pela permissão para coleta de material para análise histológica.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, especialmente à Lilian Casatti, por responder tão prontamente a todas minhas dúvidas por e-mail.

À FAPESP pela concessão da bolsa (Processo2008/56169-5).

Felicidade é quando o que você pensa, o que você diz e o que você faz estão em harmonia.

Mahatma Gandhi

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
As Serpentes.....	3
Os gêneros <i>Crotalus</i> e <i>Bothrops</i>	3
Biologia reprodutiva de Serpentes.....	6
Objetivos.....	10
Objetivo geral.....	10
Objetivos específicos.....	10
Referências.....	11
 Capítulo I: Reproductive Biology of the neotropical rattlesnake <i>Crotalus durissus</i> from northeastern Brazil: influence of climatic variables and phylogenetic conservatism.....	17
Abstract.....	18
Introduction.....	18
Material and methods.....	19
Results.....	24
Discussion.....	29
Acknowledgments.....	34
References.....	34
 Capítulo II: Biologia reprodutiva de <i>Bothrops leucurus</i> da Floresta Atlântica do Brasil.....	40
Resumo.....	41
Introdução.....	41
Material e métodos.....	42
Resultados.....	46
Discussão.....	52
Referências.....	59

Capítulo III: Estratégias reprodutivas de <i>Bothrops erythromelas</i> das caatingas do Brasil: maturação e dimorfismo sexual, ciclos reprodutivos e variação intrapopulacional do padrão de estocagem de esperma nos machos.....	66
Resumo.....	67
Introdução.....	67
Material e métodos.....	68
Resultados.....	71
Discussão.....	75
Referências.....	79
Conclusões gerais.....	83
Apêndice.....	86

Resumo

Dados sobre a biologia reprodutiva (e.g. ciclos reprodutivos, maturação e dimorfismo sexual, padrões de estocagem de esperma e padrões de atividade) de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical, *Crotalus durissus* (N = 228), *Bothrops leucurus* (N = 320) e *Bothrops erythromelas* (N = 239), são apresentados neste estudo. Os machos atingem a maturidade sexual com comprimento rostro-cloacal (CRC) menor que as fêmeas em *B. erythromelas* e *B. leucurus*. Nas populações de *C. durissus* da região Nordeste do Brasil, machos e fêmeas atingem a maturidade sexual com comprimentos semelhantes, porém há relatos de padrões diferentes para outras populações. Não há diferença quanto ao CRC de machos e fêmeas sexualmente maduros de *C. durissus* e *B. leucurus*, espécies para as quais há relato de combate entre os machos. Fêmeas de *B. erythromelas* são maiores que os machos, característica esperada para uma espécie em que não há a ocorrência de combate. Os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas das três espécies, descritos com base em análises morfológicas e histológicas das gônadas e vias genitais, são sazonais e influenciados tanto pelas condições climáticas quanto pelas relações filogenéticas. O período de vitelogênese ocorre ao longo de grande parte do ano em *B. leucurus* e *B. erythromelas* e em um período mais restrito em *C. durissus*, durante o outono e a primavera. Relatos de acasalamento durante o outono estão disponíveis para as três espécies, embora para *B. leucurus* o acasalamento também possa ocorrer durante o inverno. Em *B. leucurus* e *C. durissus*, após a cópula, os espermatozóides permanecem estocados no trato reprodutivo da fêmea, no interior da contração muscular uterina, até o momento da ovulação e fertilização (final do inverno - início do verão). É provável que as fêmeas de *B. erythromelas* também utilizem a estratégia de estocagem de esperma, uma vez que a cópula e a ovulação ocorrem em momentos distintos, porém esta hipótese não foi comprovada neste estudo. O período de nascimento dos filhotes das três espécies é concentrado no verão, mas também pode ocorrer durante o outono. O ciclo reprodutivo dos machos de *C. durissus* apresenta variação intraespecífica: na região das caatingas no nordeste do Brasil é caracterizado como pré-nupcial, com espermatogênese simultânea a cópula, enquanto no sudeste do Brasil (região mais fria), o ciclo é pós-nupcial, com produção de espermatozóides dissociada da época de acasalamento. O ciclo reprodutivo de *B. erythromelas* da região das caatingas é pós-nupcial e possivelmente influenciado pelas condições climáticas: a espermatogênese ocorre durante a estação chuvosa, época em que as presas desta espécie são mais abundantes. Em *B. erythromelas* ocorre variação intrapopulacional em relação ao padrão de estocagem de esperma nos ductos deferentes. Já os machos das populações estudadas de *B. leucurus*, da região costeira de Mata Atlântica do Espírito Santo e Bahia, apresentam ciclo pré-nupcial e modificações estruturais no ducto deferente associadas à estocagem de esperma durante o verão e outono, simultaneamente a espermatogênese nos testículos. O período de maior atividade das três espécies é o outono, época que coincide com o acasalamento.

Palavras-chave: *Crotalus durissus*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops erythromelas*, ciclos reprodutivos, estocagem de esperma, espermatogênese, dimorfismo sexual

Abstract

New data about reproductive biology (e.g. reproductive cycles, sexual maturation and dimorphism, sperm storage and activity patterns) of three species of Viperidae snakes from the Neotropical region, *Crotalus durissus* (N = 228), *Bothrops leucurus* (N = 320) and *Bothrops erythromelas* (N = 239), are presented. *B. erythromelas* and *B. leucurus* males attain sexual maturity at smaller sizes (snout-vent length – SVL) than conspecific females. *C. durissus* males and females from northeastern Brazil attain sexual maturity at similar sizes. However, other sexual maturity patterns have already been described for other populations. No significant difference was observed on SVL between mature males and females of *C. durissus* and *B. leucurus*. Male-male combat behavior has been previously described for these species. *B. erythromelas* females are larger than males and male-male combat has never been reported for this species. Reproductive cycles are described considering morphological and histological analysis of the gonads and genital ducts. Reproductive cycles of the three species considered herein are seasonal and influenced by climatic conditions and phylogenetic relationships. Secondary vitellogenic follicles may be found in every season in *B. leucurus* and *B. erythromelas*, and only during autumn and spring in *C. durissus*. Records of mating during the autumn are available for the three studied species, but it may also occur during winter in *B. leucurus*. After mating, spermatozoa are stored in the female reproductive tract by means of an uterine muscular twisting (UMT) until ovulation and fertilization occur (end of winter – beginning of summer) in *C. durissus* and *B. leucurus*. It is probable that it also occurs in *B. erythromelas* because mating and ovulation are not synchronous in this species either. However, we did not find evidences for the occurrence of the UMT to confirm this hypothesis for *B. erythromelas*. Parturition occurs during the summer and some births may occur in the autumn too. Intraspecific variation occurs in *C. durissus* male reproductive cycle: it may be categorized as pre-nuptial, with spermatogenesis synchronous to mating, in the Brazilian northeastern region, and post-nuptial in the Brazilian southeastern region, a colder area where sperm production and mating are synchronous. Male reproductive cycle of *B. erythromelas* from the caatinga region is post-nuptial and possibly influenced by climatic conditions: spermatogenesis occurs in the rainy season when preys are more abundant. Sperm storage patterns in the deferent ducts exhibits intrapopulational variation in *B. erythromelas*. Populations of *B. leucurus* from the Atlantic coastal region of the States of Espírito Santo and Bahia present male pre-nuptial reproductive cycle and the deferent duct shows structural changes associated with sperm storage during summer and autumn when spermatogenesis occurs. The peak of activity for the three species occurs during the autumn, in the mating season.

Key words: *Crotalus durissus*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops erythromelas*, reproductive cycles, sperm storage, spermatogenesis, sexual dimorphism

Introdução geral

As serpentes

As serpentes e os “lagartos” fazem parte da mesma linhagem evolutiva denominada Squamata, o maior grupo de répteis viventes. Na realidade, as serpentes são lagartos especializados nos quais ocorreu a perda dos membros (embora este evento também tenha ocorrido diversas vezes em outros grupos de lagartos) (POUGH et al., 2004).

Há duas hipóteses sobre o surgimento das serpentes baseadas em fósseis de serpentes com patas posteriores. A hipótese mais antiga é de que as primeiras serpentes teriam origem marinha e seriam derivadas de um grupo de lagartos marinhos do Cretáceo superior, os mosassauros (CALDWELL & LEE, 1997). A hipótese mais recente, de que as serpentes teriam origem terrestre, é baseada no fóssil da serpente mais primitiva conhecida até o momento: a *Najash rionegrina*, que apresentava patas traseiras funcionais e provavelmente possuía hábitos fossoriais ou criptozóicos (APESTEGUÍA & ZAHER, 2006).

A capacidade das serpentes injetarem veneno surgiu mais recentemente, nos membros da superfamília Colubroidea (CADLE, 1983). Dentre estas, encontram-se as serpentes da Família Viperidae que possuem dentição solenóglifa, ou seja, apresentam presas perfeitamente canaliculadas que permitem uma injeção de veneno bastante eficaz em suas presas (GREENE, 1997).

As serpentes da Família Viperidae são agrupadas em três subfamílias com representantes viventes: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae. Dentre estes, podemos encontrar apenas representantes da subfamília Crotalinae no continente americano (FRANCO, 2003). As serpentes deste grupo apresentam uma característica única, a fosseta loreal, um órgão termossensível (GREENE, 1997). A subfamília Crotalinae possui mais de 20 gêneros e 170 espécies (FRANCO, 2003). No Brasil são encontrados os gêneros *Crotalus*, *Bothrops*, *Bothrocophias* e *Lachesis* (FRANCO, 2003).

Para esta dissertação foram coletados dados inéditos sobre a biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae que ocorrem no Brasil: *Bothrops erythromelas*, *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus*.

Os gêneros *Crotalus* e *Bothrops*

O gênero *Crotalus* abrange muitas espécies distribuídas desde o Canadá até a América do Sul (FITCH, 1970). A origem (PLACE & ABRAMSON, 2004) e diversificação (FITCH, 1970) deste clado provavelmente ocorreram na região do México. O complexo *Crotalus*

durissus é o único representante do gênero a se estender além do sul do México (CAMPBELL & LAMAR, 2004). As populações de *C. durissus* estão divididas em 11 subespécies (CAMPBELL & LAMAR, 1989) e as linhagens da América Central são mais antigas que as linhagens da América do Sul (WÜSTER et al., 2002).

Os baixos níveis de divergência entre as sequências de nucleotídeos das populações sul americanas de *Crotalus durissus* são consistentes com a hipótese de que esta espécie invadiu a América do Sul durante o Pleistoceno, entre 1 a 2 milhões de anos atrás, após o soerguimento da ponte do Panamá, que conectou, por via terrestre, as biotas dos continentes norte e sul americanos (WÜSTER et al., 2005a; QUIJADA-MASCAREÑAS et al., 2007). A dispersão de *Crotalus durissus* teria ocorrido por meio de um corredor central na Amazônia de vegetação seca (área aberta ou floresta seca sazonal), que existiu entre o início e o meio do Pleistoceno (WÜSTER et al., 2005a, 2005b; QUIJADA-MASCAREÑAS et al., 2007), embora haja uma hipótese alternativa de dispersão por ambientes degradados na Amazônia durante o Pleistoceno (GOSLING & BUSH, 2005).

Todas as populações sul americanas do complexo *Crotalus durissus* são filogeneticamente muito próximas (WÜSTER et al., 2005a, 2005b; QUIJADA-MASCAREÑAS, 2007). Como os baixos níveis de divergência entre os taxa sul americanos sugerem que estas populações possuem um passado recente comum e não constituem linhagens com longas e independentes histórias evolutivas, Wüster et al (2005a) consideram desnecessária a distinção em subespécies das linhagens de *C. durissus* ao sul da Amazônia e propõe que *Crotalus durissus cascavella* e *C.d. collilineatus* sejam considerados como sinônimos de *C. d. terrificus*.

Os haplótipos ancestrais para as populações do sul do Brasil parecem estar localizados no próprio Sul e não nas populações do Nordeste (QUIJADA-MASCAREÑAS, 2007). Isto sugere que *C. durissus* tenha dispersado da atual região de Roraima para o Mato Grosso e o Sudeste do Brasil, daí então para o Nordeste. Apesar de amostrar poucas localidades na região Nordeste, Quijada-Mascareñas et al. (2007), concluem que as populações de *C. durissus* do Nordeste do Brasil parecem ser resultado de dispersão do sudeste ou da região central do Brasil. É teoricamente possível que este padrão tenha sido causado por uma dispersão inicial das Guianas ao longo da costa Atlântica, seguida de extinção das populações do nordeste do Brasil e posterior recolonização proveniente do estoque sul da população de *C. durissus*. De qualquer forma, várias linhas de evidências enfraquecem a hipótese de extinção-recolonização do Nordeste brasileiro (QUIJADA-MASCAREÑAS et al., 2007).

C. durissus é o único viperídeo de grande porte em sua área de ocorrência na região nordeste do Brasil. Embora *C. durissus* ocorra em simpatria com várias espécies de *Bothrops* nesta região, os dois gêneros são diferentes em relação ao tamanho, morfologia, comportamento, escolha de habitat e outros fatores ecológicos, o que pode reduzir a competição ecológica entre os grupos. (WÜSTER et al., 2002).

O ancestral de todas as *Bothrops* ocupou a América do Sul durante o Mioceno, entre 10 a 23 milhões de anos atrás, antes de qualquer outro viperídeo (WÜSTER et al., 2002), e muito antes da emergência do istmo do Panamá, que possibilitou a entrada de *Crotalus durissus*. A quantidade atual de espécies de *Bothrops* na região neotropical é grande: cerca de 40 espécies, distribuídas do México até a Argentina, em vários tipos de ambientes, desde florestas chuvosas até regiões áridas (CAMPBELL & LAMAR, 1989). Esta alta diversificação pode ser explicada por diversos eventos de radiação adaptativa em função da grande amplitude de nichos vagos em função da inexistência anterior de viperídeos na América do Sul. Uma única espécie, *Bothrops asper*, reinvadiu a América Central e continua a ser a única espécie do gênero de ampla distribuição naquela região (WÜSTER et al., 2002).

Estudos de sistemática filogenética indicam que as espécies de *Bothrops* podem ser agrupadas em sete grupos monofiléticos: *alternatus*, *atrox*, *jararaca*, *jararacussu*, *microphthalmus*, *neuwiedi* e *taeniatus* (SALOMÃO et al., 1999).

Recentemente, Fenwick et al. (2009) propuseram a divisão do gênero *Bothrops* em vários gêneros (*Rhinocerophis*, *Bothropoides*, *Bothriopsis* e *Bothrops*). Esta nova nomenclatura torna obscura toda história evolutiva comum do gênero *Bothrops*, somente para tornar válido o gênero *Bothriopsis*, que é considerado como sinonímia de *Bothrops* por Wüster et al. (2002). Além disso, reconhecer *Bothrops* como um gênero único e diverso é a forma mais apropriada e parcimoniosa de se referir à unidade evolutiva e à biogeografia histórica deste clado (WÜSTER et al., 2002). Por isto, a nomenclatura antiga será adotada neste estudo.

Bothrops erythromelas pertence ao grupo *B. neuwiedi* (WÜSTER et al., 1997; 1999; 2002). Esta espécie noturna, terrestre e de pequeno porte, está distribuída ao longo das caatingas do Nordeste brasileiro (RODRIGUES, 2003; MARTINS et al., 2001). Segundo Campbell & Lamar (2004), existem poucos dados sobre a biologia de *B. erythromelas*. Esta espécie, que não apresenta mudança ontogenética em sua dieta, alimenta-se de invertebrados, anfíbios, lagartos e mamíferos (MARTINS et al., 2002).

Bothrops leucurus pertence ao grupo *atrox* (Wüster et al., 1997; 1999; 2002) e pode ser encontrada em florestas primárias de Mata Atlântica, plantações de coco, brejos e pastagens

(RIPA, 1997), ao longo da região costeira dos Estados de Espírito Santo, Sergipe, Alagoas e Ceará, além do litoral e parte do interior da Bahia (PORTO & TEIXEIRA, 1995; RIPA, 1997; CAMPBELL & LAMAR, 2004). Esta espécie possui hábito alimentar generalista, caráter plesiomórfico para o gênero *Bothrops*. Sua dieta inclui anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves (MARTINS et al., 2002).

Antigamente, as populações do Espírito Santo de *B. leucurus* eram denominadas *Bothrops pradoi*. Porém, após uma análise filogeográfica que combinou sequências de DNA com dados morfológicos de indivíduos do Espírito Santo e estados do Nordeste, Puerto et al. (2001) concluíram que as duas linhagens não podem ser consideradas como espécies separadas pois possuem uma história evolutiva comum e ausência de caracteres diagnósticos para separação das populações. Populações de *Bothrops atrox* de origem amazônica teriam colonizado a Mata Atlântica durante o Pleistoceno e a divergência entre os haplótipos da Amazônia e da Mata Atlântica teria ocorrido recentemente, no último milhão de anos (PUERTO et al., 2001).

Biologia reprodutiva de serpentes

Os ciclos reprodutivos dos répteis sofrem influência de fatores endógenos (e.g. ritmos internos) e exógenos (e.g. temperatura, umidade, disponibilidade de alimento) (FITCH, 1982). A influência de variáveis ambientais no ciclo reprodutivo de serpentes de regiões temperadas é demonstrada principalmente no ciclo reprodutivo dos machos. A temperatura influencia a recrudescência testicular, ou seja, o reinício do crescimento do epitélio germinativo após um período de quiescência (ALDRIDGE, 1975; DUVALL et al., 1982). Para a maioria das espécies de serpentes de regiões temperadas, a estação reprodutiva ocorre durante a primavera ou outono e os filhotes nascem do final do verão até o início do outono (ALDRIDGE, 1979; SEIGEL & FORD, 1987). Dessa forma, a gestação ocorre em períodos de temperatura relativamente altas e constantes (primavera – verão) e o nascimento dos filhotes ocorre em épocas em que a disponibilidade de presas é abundante, o que pode aumentar as chances de sobrevivência dos filhotes antes do período de hibernação no inverno (SHINE, 1977a, b).

Alguns autores sugerem que serpentes de regiões tropicais devem apresentar ciclos reprodutivos contínuos, em função das condições climáticas estáveis e favoráveis ao longo do ano (altas temperaturas) aliadas à alta disponibilidade de recursos alimentares (FITCH, 1982; VITT & VANGILDER, 1983). Porém, dados recentes mostram que algumas espécies de regiões de clima tropical apresentam sazonalidade nos ciclos reprodutivos (e.g. MARQUES, 1996; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 2002; VALDUJO et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2003; SHINE, 2003; SCARTOZZONI & MARQUES, 2004; PIZZATTO, 2006).

A maior parte do território brasileiro está situada na faixa intertropical, o que confere ao Brasil as características de um país de clima tropical (quente e úmido). A variedade de tipos climáticos é refletida no mosaico de paisagens naturais encontradas no território brasileiro (MENDONÇA & DANNI-OLIVEIRA, 2007). Algumas regiões brasileiras possuem características climáticas únicas, como é o caso da Região Nordeste. A faixa litorânea, pela qual se estende a Zona da Mata (Mata Atlântica) e vegetações de transição para outros domínios morfo-climáticos apresenta índices de pluviosidade elevados e constantes ao longo do ano. Já a porção interior do Nordeste, onde ocorre o domínio das caatingas, onde está localizado o polígono das secas, é caracterizada não somente pelos baixos índices de pluviosidade, mas também pela irregularidade climática da região: em alguns anos ocorrem secas prolongadas, em outros, inundações (AB'SABER, 2005).

Estudos que procuram demonstrar a influência de variáveis climáticas sobre os ciclos reprodutivos de serpentes da região tropical são escassos na literatura. Solórzano e Cerdas (1989) estudaram duas populações de *Bothrops asper* isoladas por uma cadeia de montanhas na Costa Rica: uma população na região voltada para o Oceano Pacífico, com estação seca e chuvosa bem definida e a outra população voltada para o Oceano Atlântico, onde não há estação seca bem definida. Nesse estudo, eles identificaram diferenças quanto à época de acasalamento e nascimento dos filhotes entre as duas populações. Tais diferenças foram atribuídas às diferenças climáticas encontradas entre as duas regiões, entretanto, os autores não explicam de forma clara como estas diferenças climáticas poderiam influenciar ou não o ciclo reprodutivo das duas populações.

Pizzatto e Marques (2006) encontraram variações quanto ao ciclo reprodutivo de populações da serpente aquática *Liophis miliaris* de acordo com as características climáticas de cada localidade. A população do sul do Estado da Bahia, Nordeste do Brasil, região com clima quente e chuvoso ao longo do ano todo apresentou ciclo reprodutivo contínuo (vitelogênese ao longo do ano todo), enquanto as outras populações localizadas mais ao sul do Brasil, nos Estados de São Paulo e Paraná apresentaram ciclo reprodutivo sazonal e relacionado aos períodos mais quentes e chuvosos. De acordo com os autores, o ciclo reprodutivo contínuo da população de *L. miliaris* da Bahia pode estar associado à disponibilidade de recursos alimentares ao longo do ano em função da homogeneidade do clima.

Moraes (2008) investigou a ocorrência de variações relacionadas a aspectos reprodutivos entre populações de *Bothrops jararaca* do litoral e áreas de altitudes mais elevadas do Estado de São Paulo. Nesse trabalho, foram encontradas diferenças significativas

entre a fecundidade e o tamanho em que os indivíduos atingem a maturidade sexual entre as duas populações. O autor relacionou estas diferenças à dieta mais calórica ingerida pelas populações de altitude mais elevadas, o que proporcionaria, pelo menos em parte, condições para que esta população atinja a maturidade sexual mais cedo e apresente maior fecundidade em relação à população do litoral. Por outro lado, apesar de haver diferenças climáticas entre as duas regiões, não há diferença quanto ao ciclo reprodutivo entre as duas populações, o que corrobora a hipótese de Almeida-Santos e Salomão (2002) para um ciclo reprodutivo conservativo no gênero *Bothrops*, ou seja, os fatores históricos (filogenéticos) podem exercer tanta ou até mais influência na determinação dos ciclos reprodutivos das serpentes do gênero *Bothrops* do que características ambientais atuais.

Apesar de não haver informações suficientes para que a influência das relações filogenéticas nos ciclos reprodutivos da maioria dos grupos das serpentes brasileiras seja determinada (PIZZATTO et al., 2007), esta relação vem sendo demonstrada para as serpentes da Família Viperidae, principalmente para os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997; 2002).

O ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* do sudeste do Brasil é relativamente bem conhecido (e.g., ALMEIDA-SANTOS, 2005; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004 a,b; ALMEIDA-SANTOS & ORSI, 2002; SALOMÃO & ALMEIDA-SANTOS, 2002; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997). Estes autores encontraram muitas semelhanças nas estratégias reprodutivas (e.g., acasalamento no outono, estocagem de esperma pelas fêmeas durante o inverno, com ovulação e fertilização na primavera) entre os ciclos reprodutivos das *Crotalus* de regiões temperadas e *C. durissus* da região sudeste do Brasil (clima tropical), o que corrobora a hipótese da influência filogenética na determinação dos ciclos reprodutivos deste gênero.

Os ciclos descritos para várias espécies de *Crotalus* também apresentam muitas semelhanças com os ciclos reprodutivos de serpentes do gênero *Bothrops*, como a presença de estocagem de esperma no útero durante o inverno e fertilização na primavera (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 2002). Por outro lado, ainda há muitos aspectos desconhecidos sobre as estratégias reprodutivas empregadas por populações de *C. durissus* de outras regiões do Brasil (Nordeste, Centro-Oeste, populações isoladas nas savanas amazônicas) e por várias espécies de *Bothrops*, principalmente em relação ao ciclo reprodutivo dos machos. Este estudo sobre a biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical (*Crotalus durissus*, *Bothrops leucurus* e *Bothrops erythromelas*) contribui para o conhecimento das estratégias reprodutivas empregadas por este grupo e para a

discussão da influência das condições climáticas e das relações filogenéticas sobre a determinação dos eventos reprodutivos nestas espécies.

O presente estudo resultou na elaboração de três manuscritos que são apresentados em três capítulos. Os três capítulos abordam aspectos da biologia reprodutiva das espécies, tais como: maturação, dimorfismo sexual, ciclos reprodutivos, estocagem de esperma e relação dos padrões de atividade com os eventos reprodutivos.

No primeiro capítulo “Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from Northeastern Brazil: influence of climatic variables and phylogenetic conservatism” são apresentados dados inéditos sobre as populações da região das caatingas. A comparação com dados previamente publicados sobre outras populações do sudeste do Brasil e da América Central permite a discussão da influência das características climáticas (e.g. temperatura e pluviosidade) da região, bem como das relações filogenéticas sobre a determinação dos eventos reprodutivos na espécie. Este manuscrito foi submetido ao periódico *Herpetological Journal*.

O segundo capítulo “Biologia reprodutiva de *B. leucurus* da Floresta Atlântica do Brasil” apresenta dados sobre a biologia reprodutiva das populações dos Estados do Espírito Santo (região sudeste do Brasil) e Bahia (região nordeste do Brasil) e compara os resultados com as informações disponíveis para as demais espécies do grupo *B. atrox*, discutindo também a influência das variáveis climáticas e do conservatismo filogenético sobre o ciclo reprodutivo destas espécies. Este trabalho será submetido à revista *Journal of Herpetology*.

O terceiro capítulo “Estratégias reprodutivas de *Bothrops erythromelas* das caatingas do Brasil: maturação e dimorfismo sexual, ciclos reprodutivos e variação intrapopulacional do padrão de estocagem de esperma nos machos” apresenta dados sobre a biologia reprodutiva da espécie e discute a influência das variáveis climáticas sobre a disponibilidade de presas e seu efeito sobre o ciclo reprodutivo dos machos, além de apresentar um relato sobre a variação intrapopulacional do padrão de estocagem de esperma no ducto deferente dos machos. Este artigo será submetido ao periódico *Amphibia-Reptilia*. Todos os capítulos seguem a formatação proposta pelas revistas em que pretendemos publicar os manuscritos.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é descrever a biologia reprodutiva das populações de *Crotalus durissus* e *Bothrops erythromelas* das caatingas do Nordeste do Brasil e de *Bothrops leucurus* da região costeira de Mata Atlântica dos Estados do Espírito Santo e Bahia, bem como discutir a influência das características climáticas das regiões amostradas e das relações filogenéticas sobre a determinação dos eventos reprodutivos nestas espécies.

Objetivos específicos

- Descrever os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas por meio de análises macroscópicas e microscópicas das gônadas e vias genitais;
- Caracterizar as condições climáticas das regiões amostradas, considerando as variáveis temperatura e precipitação;
- Verificar a ocorrência de estocagem de esperma no trato reprodutivo de machos e fêmeas;
- Avaliar a existência de relação entre o padrão de atividade das espécies e os eventos reprodutivos;
- Determinar o comprimento em que a maturidade sexual é atingida em machos e fêmeas;
- Verificar a ocorrência de dimorfismo sexual
- Estimar a fecundidade e o tamanho dos filhotes ao nascer.

Referências

- AB'SÁBER, A. N. **Os domínios de natureza no Brasil:** potencialidades paisagísticas. São Paulo: Ateliê Editorial, 2005.
- ALDRIDGE, R.D. Female reproductive cycles of the *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v.35, p.256-261, 1979.
- ALDRIDGE, R.D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, p. 493-496, 1975.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes:** estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). 2005. 204p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, v.139, p.143-150, 2004a.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Sperm-storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139 (A), p.169-174, 2004b.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo Reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26 (2), p.109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W. et al. (Eds). **Biology of the vipers**. 1.ed. Utah: Eagle Publ. Mountain, 2002. p.445-462.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-Term Sperm-storage in Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, v.17 (2), p.46-52, 1997.

APESTEGUÍA, S.; ZAHER, H. A Cretaceous terrestrial snake with robust hindlimbs and a sacrum. **Nature**, v.440, n.20, p.1037-1040, 2006.

CALDWELL, M.W.; LEE, M.S.Y. A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. **Nature**, v.386, p.705-709, 1997.

CADLE, J.E. Problems and approaches in the evolutionary history of venomous snakes. **Memórias do Instituto Butantan**, v.46, p.255-274, 1983.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Latin America**. New York: Cornell University Press, 1989.

DUVALL, D. et al. Environmental control of reptilian reproductive cycles. In: GANS, C.; POUGH, F. H. (Eds.). **Biology of Reptilia**. New York: Academic Press, 1982. p.201-231.

FENWICK, A.M. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.156, p. 617–640, 2009.

FITCH, H. Reproductive cycles of lizard and snakes. **Miscellaneous publications – University of Kansas, Museum of Natural History**. 247p., 1970.

FITCH, H. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas**, v.96, p. 1-53, 1982.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

GOSLING, W.D; BUSH, M.A. A biogeographic comment on: Wüster *et al.* (2005) Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v.14, p.3615–3617, 2005.

GREENE, H.W. **Snakes**: the evolution of mystery in nature. Berkeley: University of California Press, 1997.

MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic Forest of Brazil. **Amphibia-Reptalia**, v.17, p.277-285, 1996.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W. et al. (Eds). In: **Biology of the vipers**. 1.ed. Utah: Eagle Publ. Mountain, 2002. p.307- 328.

MARTINS, M. et al. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). **J. Zool. Lond.**, v. 254, p.529-538, 2001.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. **Climatologia**: noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: Oficina de Textos, 2007.

MORAES, R. **Variações em caracteres morfológicos e ecológicos em populações de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae) no estado de São Paulo**. 2008. 142p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

PIZZATTO, L., ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: Nascimento, L. B.; Oliveira, M. E. (Ed.). **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007. p.201-211.

PIZZATTO, L. **Ecomorfologia e estratégias reprodutivas nos Boidae (Serpentes), com ênfase nas espécies neotropicais**. 2006. 151p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

PLACE, A. J.; ABRAMSON, C.I. A quantitative analysis of the ancestral area of rattlesnakes. **Journal of Herpetology**, v.38, p.151-156, 2004.

POUGH, F.H. et al. **Herpetology**. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004.

PORTO, M.; TEIXEIRA, D. M. Geographic distribution: *Bothrops leucurus* (White-tailed lancehead). **Herpetological Review**, v. 26(3), p.156, 1995.

PUORTO, G. et al. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Journal of Evolutionary Biology**, v.14, p.527-538, 2001.

QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A. et al. Phylogeographic patterns of trans-amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. **Journal of Biogeography**, v.34, p.1296-1312, 2007.

RIPA, D. Range extension for *Bothrops leucurus*. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, v.32(2), p.25-26, 1997.

RODRIGUES, M. T. Herpetofauna da caatinga. In: LEAL, I. R. et al. (Eds.) **Ecologia e conservação da caatinga**. Pernambuco: Editora Universitária da UFPE, 2003. p.181-236.

SALOMÃO, M.G. ; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of Male Neotropical Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G. W. et al. (Eds). **Biology of the vipers**. 1.ed. Utah: Eagle Publ. Mountain, 2002. p.507- 513.

- SALOMÃO, M. G. et al. Mt DNA evolution in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia*, v.8, p.127-134, 1999.
- SCARTOZZONI, R. R.; MARQUES, O. A. V. Sexual dimorphism, reproductive cycle, and fecundity of the water snake *Ptycophis flavovirgatus*. **Phyllomedusa**, v.3, p.69-71, 2004.
- SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: SEIGEL, R. A. et al. (Eds.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan, 1987, p. 210-252.
- SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.270, p. 995-1004, 2003.
- SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes: I. Testicular cycles and matting seasons. **Australian Journal of Zoology**, v.25, p. 647-653, 1977a.
- SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes II. Female reproductive cycles. **Australian Journal of Zoology**, v.25, p. 655-666, 1977b.
- SOLÓRZANO, A. & CERDAS, L. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. **Herpetologica**, v.45(4), p. 444-450, 1989.
- VALDUJO, P.H.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v.36, p.169-176, 2002.
- VITT, L.S.; VANGILDER, L. D. Ecology of a Snake community in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v.4, p.273-296, 1983.
- WÜSTER, W. et al. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v.14, p.1095-1108, 2005a.

WÜSTER, W. et al. No rattlesnakes in the rainforests: reply to Gosling and Bush. **Molecular Ecology**, v.14, p.3619–3621, 2005b.

WÜSTER, W. et al. Origins and Evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: SCHUETT, G. W. et al. (Eds). **Biology of the vipers**. 1.ed. Utah: Eagle Publ. Mountain, 2002. p.111- 128.

WÜSTER, W. et al. Mitochondrial DNA phylogeny of the *Bothrops atrox* species complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Kaupia**, v.8, p.135-144, 1999.

WÜSTER, W. et al. Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v.70, p.99-113, 1997.

Capítulo I

Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*
from Northeastern Brazil: influence of climatic variables and
phylogenetic conservatism

Artigo submetido - Herpetological Journal

Abstract

This study provides data on the aspects of reproductive biology (sexual dimorphism, reproductive maturation, vitellogenic and spermatogenic cycles and sperm storage patterns) of *Crotalus durissus* from the northeastern region of Brazil. A comparison with populations from southeastern Brazil and Central America is presented based on previously published data. The hypothesis of climatic influence on male and female reproductive cycles was tested. Despite favorable climatic conditions in northeastern Brazil, copulation (autumn) is not synchronous to ovulation and fertilization (spring). Thus, sperm is stored over winter in the female reproductive tract by means of an uterine muscular twisting (UMT) and long-term sperm storage is an obligatory component of *C. durissus* females reproductive cycle from northeastern Brazil. The same reproductive strategy has been previously described for *C. durissus* females from southeastern Brazil. Therefore, female reproductive events showed a phylogenetically conserved pattern regardless of climate differences among northeastern and southeastern Brazil. Intraspecific variation was detected in male reproductive cycles, which were influenced by temperature. Males from northeastern region, where temperature is high throughout the year, presented prenuptial spermatogenic cycle, with sperm production synchronous to mating in the autumn. This pattern is different from postnuptial spermatogenic cycle, previously described to *C. durissus* from southeastern Brazil and other species of *Crotalus* from temperate areas.

Introduction

Rattlesnakes (genera *Crotalus* and *Sistrurus*) belong to a monophyletic group of pitvipers (Parkinson, 1999; Murphy et al., 2002) originated in Mexico (Armstrong & Murphy, 1979; Greene, 1997; Place & Abramson, 2004), currently distributed from Canada to Argentina (Klauber, 1972). *Crotalus durissus* is the only rattlesnake species that occurs in South America (Campbell & Lamar, 2004). According to Wüster et al (2005), *C. durissus* colonized South America during the Pleistocene, between 1 and 2 million of years ago, after the uplift of the Isthmus of Panamá. As this species is not found in tropical rain forests, only in savanna, dry seasonal forests and disturbed areas (Campbell & Lamar, 2004) the dispersal across the Amazon basin to more southerly parts of South America would have occurred through a Pleistocene trans-Amazonian corridor of savanna or dry forest vegetation (Wüster et al, 2005; Quijada-Mascareñas et al. 2007; but see Gosling & Bush, 2005 for an alternative

hypothesis). The species phylogeographic pattern described in Quijada-Mascareñas et al. (2007) suggests that the populations of northeastern Brazil are a result of the dispersal from southern and/or central Brazil populations.

C. durissus from southeastern Brazil and other species of the genus from temperate regions present a similar pattern in the reproductive cycles attributed to phylogenetic conservatism (Almeida-Santos et al., 2004a; 2004b). Spermatogenesis begins in spring and reaches its peak in the summer, during the warmer season of the year in southeastern Brazil (Salomão and Almeida-Santos, 2002). Sperm is stored in male deferent ducts until mating occurs in the autumn (Almeida-Santos et al., 2004b). Ovulation and fertilization are not synchronous to mating and females present long-term sperm storage by means of an uterine muscular twisting (UMT) (Almeida-Santos & Salomão, 1997). Vitellogenesis starts in the autumn and continues through the winter until ovulation and fertilization occur in the spring. Parturition occurs in the end of spring and during the summer (Almeida-Santos & Salomão, 2002).

The aim of this study was to provide data on the fundamental aspects of the reproductive biology of *C. durissus* from the northeastern region of Brazil, such as timing of mating, sexual dimorphism, sexual maturation, vitellogenic and spermatogenic cycles, and sperm storage patterns. An association between these reproductive events and activity periods was investigated. In order to test the hypothesis that timing of reproductive events in males (e.g. spermatogenic cycle) and females (e.g. vitellogenic cycle, parturition date and sperm storage in the uterus) could be influenced by the climatic differences between northeastern and southeastern regions in Brazil, we also compared our results with the available reproductive data on *C. durissus* population from southeastern Brazil.

Material and methods

According to Wüster et al. (2005), the three *Crotalus durissus* subspecies (*C.d. collilineatus*, *C.d. cascavella* and *C.d. terrificus sensu* Hoge, 1965) that occur south to Amazon basin are phylogenetically closely related and do not constitute independent evolutionary lineages. Thus, the subspecies designation is not adopted in this study. *Crotalus durissus* is largely distributed in Brazil, thus we arbitrarily defined two populations from different regions to be compared in this study (*cf.* Begon et al., 2006):

1. Northeastern (NE): samples of this population came from the states of Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará and Maranhão (5°11'N, 15°31'S,

7°32'E, 5°49'W, Fig.1). Snakes came from caatinga, cerrado and disturbed areas. High temperatures are maintained throughout the year in the area, even in the winter. The coldest months were July and/or August (mean temperature ranging from 13°C to 31.9°C during these months). Rainfall is concentrated in spring-summer (October to March), and autumn-winter (April – September) is really dry (Fig.2). Mean annual precipitation varies between 459 – 1214 mm among the sampled municipalities. Both sampled areas in Brazil (Northeastern and Southeastern) do not show marked seasons like temperate areas. Two distinct seasons may be recognized: a dry season and a rainy season (Fig.2). Despite this, we here deal with the four seasons to allow comparisons of our results with those on snakes from temperate areas. Data on NE population reproductive biology is presented for the first time in this paper.

2. Southeastern (SE): located in São Paulo state (22°11'N, 23°58'S, 45°11'E, 49°03'W, Fig.1). This area was covered by Atlantic Forest and cerrado in the past, but nowadays the native vegetation was almost totally removed and substituted by farmlands and urban areas. During autumn-winter (April to September), temperatures are lower than in NE localities. The coldest month is July (mean temperature ranging from 7.5°C to 24.1°C). Spring and summer (October to March) are usually rainier with higher temperatures than autumn-winter (Fig.2). Mean annual precipitation varies between 1211 – 1650 mm among the municipalities sampled by the authors. Previously published studies were considered to characterize this population reproductive biology (Almeida-Santos, 2005; Almeida-Santos et al, 2004a; 2004b; Almeida-Santos & Salomão, 1997; 2002; Salomão & Almeida-Santos, 2002; Salomão et al., 1995).



Fig.1: Geographical distribution of the specimens of *Crotalus durissus* considered in this study. Circles represent samples from northeastern population (NE) and triangles represent samples from southeastern population (SE).

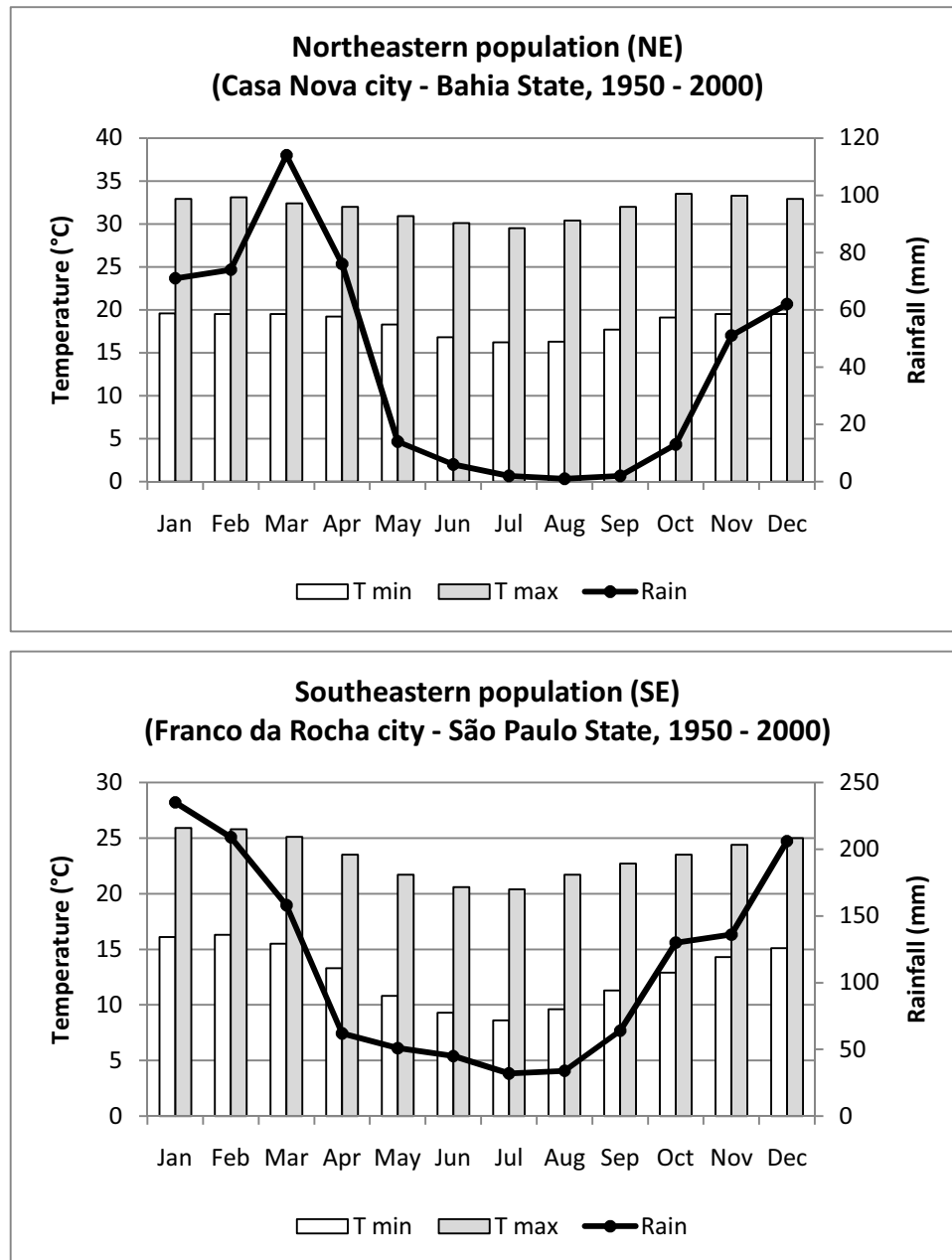


Fig. 2: Climatic patterns in the northeastern (NE) and southeastern (SE) Brazilian areas where the populations considered in this study were collected.

We examined a total of 228 preserved specimens of *Crotalus durissus* (76 adult females, 87 adult males, 48 young and 17 newborns) from NE. These specimens are held in the following collections: Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (MZUESC), Coleção Zoológica Gregório Bondar (CZGB) at CEPEC/CEPLAC (Centro de Estudos e Pesquisa do Cacau/ Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) and Coleção Herpetológica Alphonse Richard Hoge at Instituto Butantan (IB). We measured the snakes snout-vent length (SVL) to the nearest 1 mm, and after dissection the following data

were recorded: (1) diameter of the largest ovarian follicle or presence of embryos in females; (2) presence/absence of uterine muscular twisting (UMT) in females uteri; (3) oviductal condition (flat or folded); (4) presence of corpora lutea in the ovaries; (5) length, width and thickness of the right testes in males to determine testicular volume (TV) using the ellipsoid formula $TV = 4/3 \cdot \Pi \cdot a \cdot b \cdot c$, where a = half of length, b = half of width and c = half of thickness; (6) diameter of the right distal deferent duct close to the cloacae. These measures were taken to the nearest 0.1 mm.

Observation of spermatozoa in the testes or deferent ducts in microscopical analysis was used as the main criterion to determine sexual maturity in males. The convoluted aspect of deferent ducts was used as an additional criterion. Females were considered mature if they had follicles in secondary vitellogenesis, oviductal embryos, presence of corpora lutea in the ovaries or folded oviducts. Individuals that did not present any of these characteristics were considered young (= immature).

Some individuals that were housed in the collections had been already dissected and some organs were missing. The date of collection was not available in the registers for some specimens too. Thus, these exemplars could be considered only to sexual dimorphism analyses.

Sexual size dimorphism in SVL was tested by Student's t -test. The degree of sexual dimorphism (SSD) was calculated as $1 - (\text{mean adult SVL of the larger sex} / \text{mean adult SVL of the smaller sex})$ according to Gibbons & Lovich (1990) and Shine (1994). By convention, positive values of SSD correspond to females larger than males and negative values correspond to males larger than females (Shine, 1994).

Reproductive cycle of mature females was examined throughout the year in terms of length of the largest ovarian follicle or oviductal embryo. The distal portion of females uterus in the presence of UMT and secondary vitellogenic follicles simultaneously were collected to histological analysis in order to verify the existence of sperm storage in the female reproductive tract. Registers of *C. durissus* from NE maintained in captivity at IB from 1973 to 1998 and literature records were examined to obtain data on parturition period and size of newborns.

Morphological measurements of testes and deferent duct diameters were combined to histological analysis to describe the reproductive cycle of mature males. Correlation of testes volume and deferent duct diameter to body length (SVL) was tested by simple regression. Analysis of covariance (ANCOVA) was employed to compare testes volume in the four seasons of the year (summer, autumn, winter, and spring), and SVL was used as the covariate.

Differences on deferent duct diameter among the four seasons were tested by analysis of variance (ANOVA). Testes and the distal portion of deferent ducts of males were collected after dissection in order to analyze spermatogenic cycle and presence of sperm in the ducts, respectively.

All organs (uterus, testes and deferent ducts) were preserved in alcohol 70% and processed for light microscopy by the paraffin method. Sections 5 μ m thick were cut and Hematoxylin and Eosin Stain (H/E) was the histological staining method used.

We inferred snake activity by comparing the number of individuals collected in each of the four seasons (cf. Marques et al., 2001; Almeida-Santos & Salomão, 2002) using a Chi-Square test.

Statistical analyses were performed using Statistica (version 7.0) and Bioestat (version 5.00), assuming $p < 0.05$ as the criterion for significance. The analyses were carried out according to Zar (1999) and all variables were tested for normality and homoscedasticity prior to analysis.

Map and climatograms were constructed for every Municipality sampled using DIVA-GIS (version 7.1.7) and WorldClim Database (current climate: 1950-2000, version 1.3, 10 minutes resolution).

Results

SEXUAL DIMORPHISM

Mature males averaged 1134.1 mm SVL (SD = 128.3, $n = 87$, range = 820.0 - 1460.0), and mature females averaged 1115.4 mm SVL (SD = 138.4, $n = 76$, range = 830.0 – 1465.0). No significant difference ($t = -0.89$, $p = 0.37$) was observed on SVL between males and females. The degree of sexual dimorphism (SSD) was - 0.02.

FEMALE REPRODUCTIVE CYCLE AND TIMING OF PARTURITION

Primary vitellogenic follicles were present throughout the year, but secondary vitellogenic follicles were present from July to November (end of autumn to end of spring). Pregnancy was observed in October and November (spring) (Fig.3). Spermatozoa were found being stored in the uterus (UMT) of females presenting secondary vitellogenic follicles during winter (July) (Fig.4). Parturition of *C.durissus* from NE in the field has never been related. Births are more frequent in summer (Table 1).

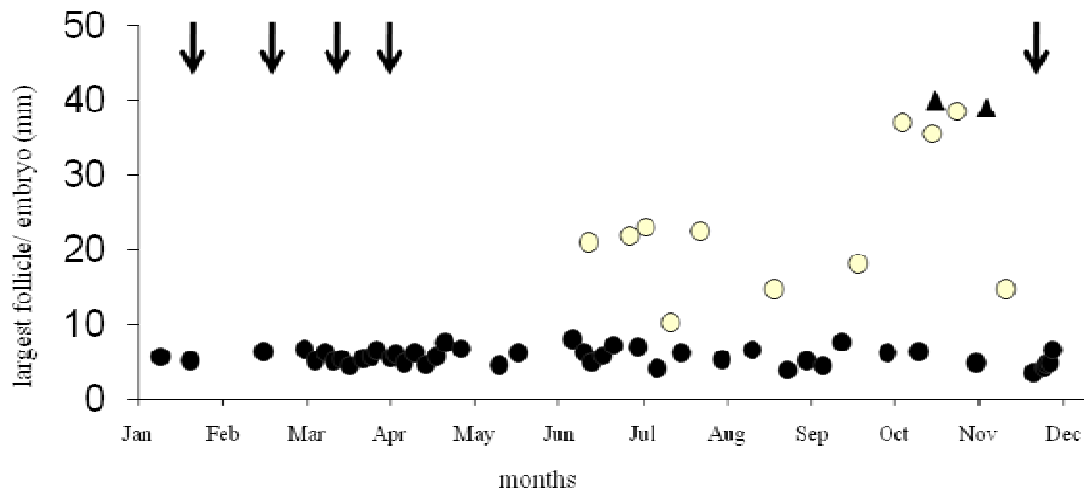


Fig. 3. Female reproductive cycle: seasonal variation in diameter of the largest ovarian follicle or embryo in mature females of *Crotalus durissus* from Northeastern Brazil (NE). Solid circles = primary vitellogenic follicles; open circles = secondary vitellogenic follicles; solid triangles = embryos in the oviducts. Arrows indicate the parturition period.

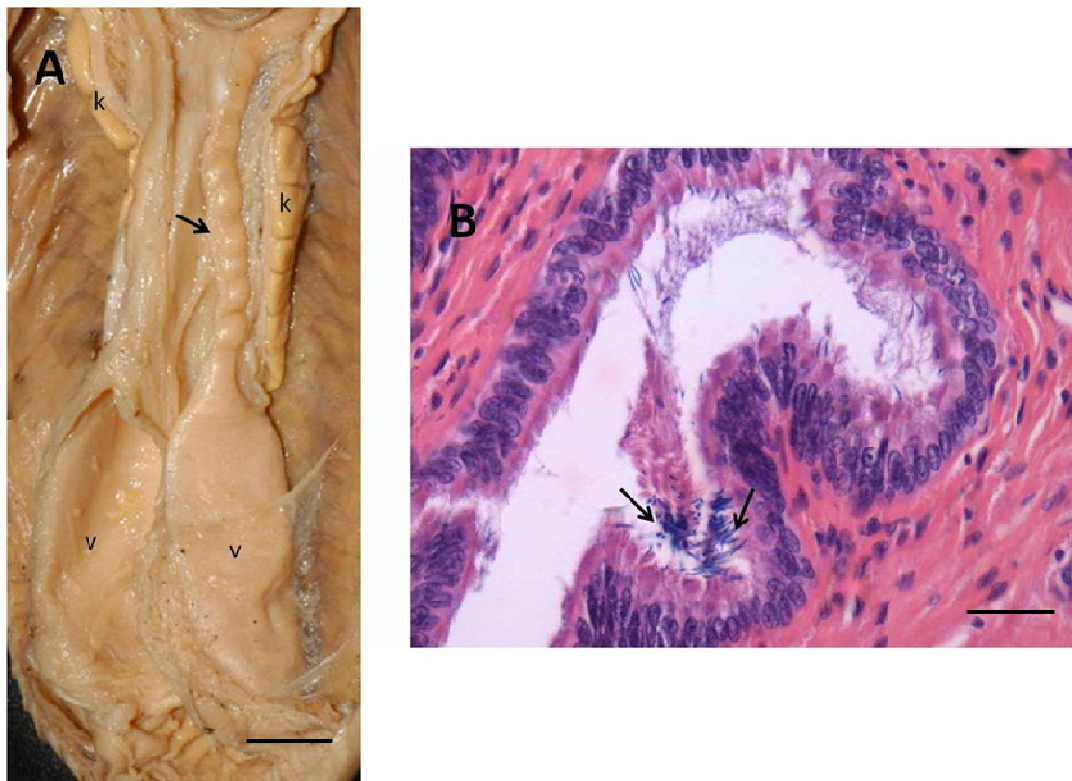


Fig. 4. Uterine muscular twisting (UMT) in *Crotalus durissus* from northeastern Brazil. A. Macroscopic view showing the vagina (v), kidneys (k). The arrow indicates the UMT in the uterus. Bar = 20 mm. B. Microscopical view. Arrows indicate the presence of spermatozoa. Bar = 30 μ m.

Table 1. Records of parturition of *Crotalus durissus* from Northeastern Brazil (NE) in captivity.

Female procedence	Timing of parturition (month/season)	Number of newborns	Size (SVL) of newborns (mm)	Institution	Reference
NE region	February 1984/Summer	21	nd	Instituto Butantan	This study
NE region	April 1984/Autumn	12	nd	Instituto Butantan	This study
NE region	March 1984/Summer	33	nd	Instituto Butantan	This study
Pernambuco	nd	17	294.35 ± 69.3	Instituto Butantan	This study
Maranhão	24 th December 1971/ Summer	22	340 – 345	Instituto Butantan	Cordeiro et al., 1981
Bahia	31 st January 1972/ Summer	16	340 – 345	Instituto Butantan	Cordeiro et al., 1981
Bahia	16 th February 1976/ Summer	22	340 – 345	Instituto Butantan	Cordeiro et al., 1981
Bahia	December to February/ Summer	15*	401.7 ± 21.6 *	Universidade Federal da Bahia	Lira-da-Silva et al., 1994
Bahia	December 2006/ Summer	9	375 ± 5.7	Instituto Butantan	J. Citadini, unpublished data

nd = not determined *This work is about 9 clutches and presents only medium values.

MALE REPRODUCTIVE CYCLE

Histological analyses show that *C. durissus* from NE presents a seasonal spermatogenic cycle. Spermiogenesis occurs in the end of summer and autumn (March to June) and peak spermatogenesis is reached during the autumn (June), synchronously to male-male combat and probably to mating. Complete regression (only spermatogonia and Sertoli cells present in the seminiferous tubules) was detected in spring (November) (Fig.7).

Simple regression showed that testes volume was positively correlated with SVL ($F = 14.2374$, $r^2 = 0.1832$, $p = 0.0007$), but deferent duct diameter was not ($F = 0.7371$, $r^2 = -0.0045$, $p = 0.6015$). Although an increase in testes volume occurs in the autumn (end of March to June) (Fig.5), simultaneously to male-male combat report, no significant differences occurred among the four seasons (ANCOVA, $F = 0.4383$, $p = 0.7303$). Sperm was present throughout the year in deferent ducts, but deferent duct diameter did not show significant variation among seasons either (Fig.6) (ANOVA, $F = 1.2934$, $p = 0.2848$).

A male-male combat episode was observed during the autumn (end of May) by A. P. Silva (pers. com.) in a pasture area at the municipality of Bom Jesus da Lapa, Bahia State. There were three snakes in the area and two snakes engaged in a male-male combat for approximately two hours.

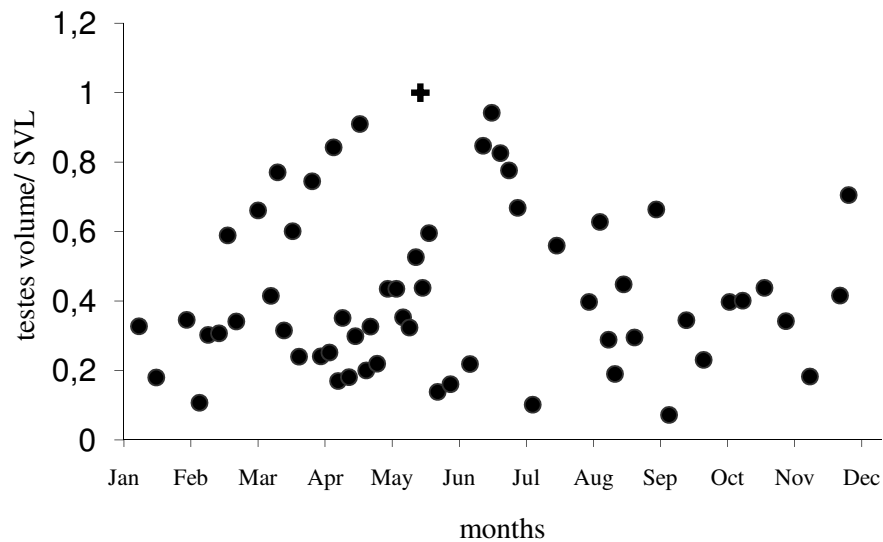


Fig.5: Seasonal variation in the relative testes volume in *Crotalus durissus* Northeastern population (NE). The cross indicates male-male combat occurrence.

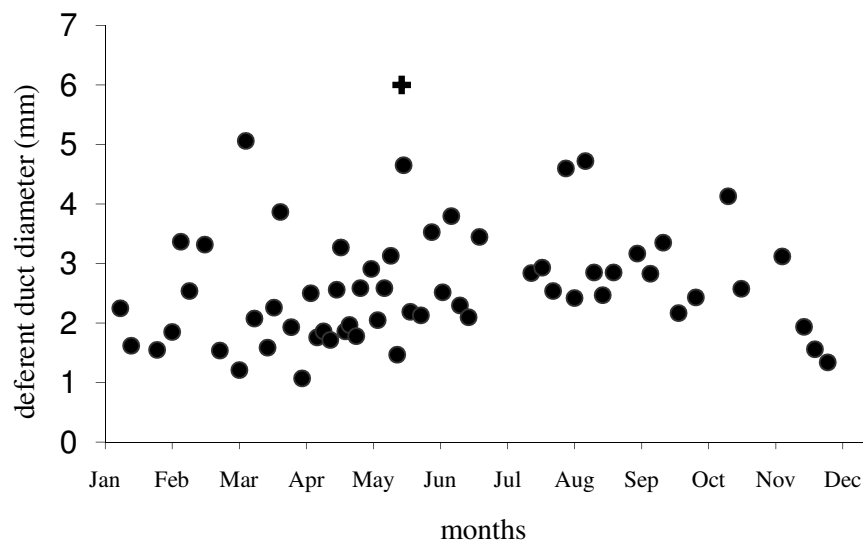


Fig.6: Seasonal variation in the deferent duct diameter (mm) in *Crotalus durissus* Northeastern population (NE). The cross indicates male-male combat occurrence.

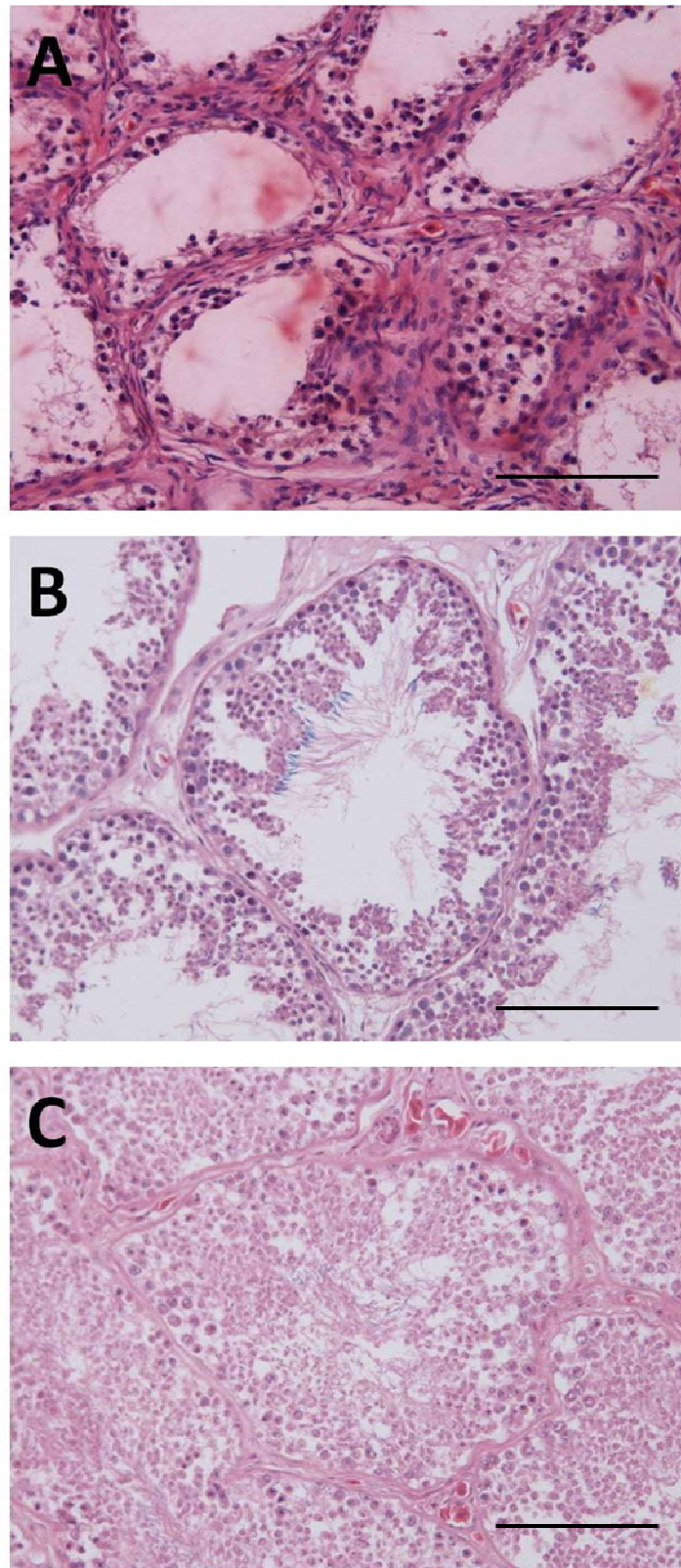


Fig. 7: Sections of the testes in *Crotalus durissus* from Northeastern Brazil. (A) Inactive period (November - spring). (B) Spermatids and the first spermatozoa (March – summer). (C) Epithelium maximal height, peak spermatogenesis (June - autumn). Bars = 100μm.

ACTIVITY PATTERNS

Adult males were most commonly collected in autumn ($\chi^2 = 5.101$, 1 d.f., $p = 0.0239$) and juveniles in winter ($\chi^2 = 4.140$, 1 d.f., $p = 0.0419$). No significant difference was observed on adult female abundance among the seasons (Fig.8).

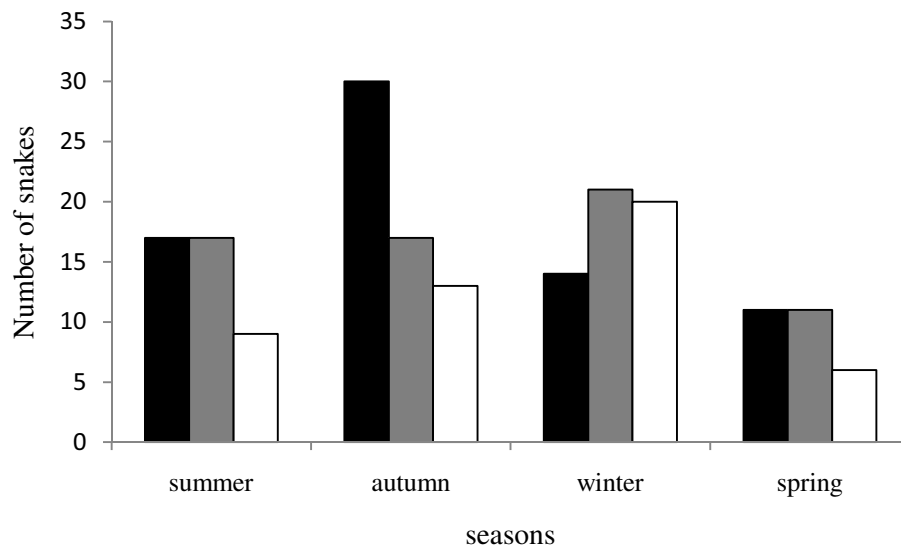


Fig. 8: Seasonal collection of *Crotalus durissus* from Northeastern Brazil (NE). Black bars = adult males, gray bars = adult females, white bars = juveniles.

Discussion

SIZE OF NEWBORNS, SEXUAL MATURATION AND DIMORPHISM

Various factors are involved in determining neonate size in snakes. Data on size of newborns is controversial in *C. durissus*. The size of newborns in NE population varies a lot according to the data set considered. Thus, additional data on this issue is needed to allow more accurate comparisons among NE and other *C. durissus* populations. However, size of newborns from SE (SVL = 297 ± 41.9 mm; Almeida-Santos, 2005) is very similar to size of newborns of a NE clutch from Recife described in this study. Males and females from NE become sexually mature at approximately the same SVL (820 mm for males and 830 mm for females). Newborns from Salvador (Bahia) maintained in captivity for 17 months were approximately 720 mm SVL (J. Citadini, unpublished data). Thus, sexual maturity may be attained at approximately 2 years old. Rattlesnakes from Central America (*C. durissus durissus*) mature at approximately the same SVL too (1000 mm for females and 1010mm for males, Solórzano & Cerdas, 1988). However, this population reaches sexual maturity at larger

sizes than *C. durissus* populations from South America. Males from SE mature at smaller SVL than females (560 mm for males and 760 mm for females; Almeida-Santos, 2005) and both sexes mature at smaller SVL than individuals from NE. These differences may be attributed to differential allocation of energy for growth or reproduction (Shine, 1980; Aubret et al., 2002) in each *C. durissus* population. *C. durissus* from NE and Central America seem to allocate more energy to growth before starting reproductive activities. This strategy has got some advantages: females may produce larger clutches as fecundity usually increases with larger body sizes in snakes (cf. Shine, 1994) and males have got more chances to be successful in male-male combats and have the access to females (Shine, 1978; Shine, 1980; Madsen & Shine, 1993). On the other hand, becoming sexually mature at smaller SVL sizes means that allocation of energy resources to reproduction begins earlier in SE population and as a consequence, less energy may be available to growth (Bonnet et al., 1998). Thus, females from SE are smaller (SVL = $985.0 \text{ mm} \pm 85.0$; Almeida-Santos, 2005) than NE (SVL = $1115.4 \text{ mm} \pm 138.4$) and Central America (SVL = 1270 mm, range 1000 – 1600 mm; Solórzano & Cerdas, 1988) females. Earlier maturation may not be advantageous for SE females because there are costs like decreased fecundity (SE clutch size = 11.7 ± 5.1 ; Almeida-Santos, 2005) in relation to NE (see Table 1) and Central America (clutch size = 22.9 ± 5.9 , range 14 – 35 newborns; Solórzano & Cerdas, 1988) populations.

The costs of maturation at smaller sizes may not be so high for males if only sperm production is considered (but see Olsson et al., 1997). A small male sometimes may be able to obtain copulations without the need to engage in male-male combats with larger males if there is significant spatial or temporal heterogeneity in adult sex ratios (Shine, 1994). However, there are many different explanations to intraspecific variation in sexual maturation (see Bronikowski & Arnold, 1999 and references cited therein). The garter snake (*Thamnophis elegans*) exhibits intraspecific variation in reproductive maturation and fecundity among other life history traits (Bronikowski & Arnold, 1999). These authors attributed this variability to differences in prey type (fish, leech and anuran) and availability among the habitats occupied by different populations. Only rats were identified in stomach contents of NE population (pers. obs.), but Vanzolini et al. (1980) relate that rattlesnakes prey on pigeons in caatinga region as well. As pigeons and introduced species of rats may be considered pests (Fall & Jackson, 1998), food availability does not seem to be a limiting factor to reproduction for those rattlesnakes which live in disturbed areas where these preys are abundant. On the other hand, it might not be true to *C. durissus* populations that live in

caatinga conserved areas because native small mammals may be a scarce resource in those areas (Mares et al., 1981; Freitas et al., 2005).

Male-male combat is a behavioral characteristic very strongly conserved along phylogenetic lineages (Shine, 1994). As its occurrence had already been related to *C. durissus* SE population (Santos, 1990) and other species of the genera (see Shine, 1994 for a review), male-male combat was expected to occur in NE population. According to Shine (1994), negative values of SSD index, as those found for *C. durissus* from NE (SSD = - 0,02), SE (SSD = - 0,01; Almeida-Santos, 2005) and Central America (SSD = - 0,07; Solórzano & Cerdas, 1988) are another evidence that reinforces the occurrence of male- male combat. These values indicate that males grow larger than conspecific females in these populations. However, enhanced fecundity (as litter size increases with body size) and viviparity also impose selective advantages for the evolution of large body sizes in females of genus *Crotalus*. The larger size of males would be a consequence of prolongation of male growth after maturation (Shine, 1994).

ACTIVITY PATTERNS

Activity patterns also seem to be related to reproductive and climatic conditions in NE population. Adult males were more abundant in autumn, when male-male combat and mating happen. The same activity pattern was described for SE population. This peak of activity is probably due to active female searching for mating (Salomão et al., 1995) and increased feeding activity as preys seems to be more abundant during this season (Freitas et al., 2005). On the other hand, adult females from NE are almost equally abundant throughout the year, although it is often assumed that they would be more easily collected when they are vitellogenic or carrying a clutch because they may present a substantial increase in weight (and reduced ability to escape from predators as a consequence) and they should also spend more time basking during these periods (Seigel et al., 1987; Gibbons & Semmlitsch, 1987; Salomão et al., 1995). Reproductive females from NE may not need to spend more time basking due to the maintenance of high temperatures throughout the year in NE region. Thus, these individuals would not be more exposed to collection due to thermoregulation activities in this region. However, an experimental approach is needed to confirm or refute these hypotheses. Juveniles that were born in the summer may be more abundant in the winter because their initial energetic stores (yolk) probably have already been totally depleted at this season and they would be looking for food.

REPRODUCTIVE CYCLES

Considering intraspecific variation among males and females reproductive cycles of NE and SE *C. durissus* populations, we observed that females presented a highly phylogenetically conserved pattern and males showed plasticity responses to environmental conditions.

The timing of females reproductive events is very similar in NE and SE populations despite different climatic conditions among the areas. Secondary vitellogenesis occurs from the end of autumn throughout the winter, until ovulation occurs in the spring. Females store sperm over winter by means of an uterine muscular twisting (UMT) in both populations. As ovulation and mating are not synchronous, this strategy of long-term sperm storage is important to guarantee that fertilization occurs in the spring (Schuett, 1992). Parturition also occurs during the same seasons (summer and beginning of autumn) in both populations (*cf.* Almeida-Santos & Salomão, 1997; 2002 for data about SE population). This pattern is really similar to Viperidae females reproductive cycles from temperate regions, despite the occurrence of continuous vitellogenic cycle throughout the winter and absence of hibernation during this season in *C. durissus* from the Neotropical region (Almeida-Santos & Salomão, 1997). Sperm storage was not expected to be an obligatory component of reproductive cycles of snake species which live in tropical areas (Saint Girons, 1982). This author arguments that under favorable climatic conditions, especially high temperatures as we observe in Brazil Northeastern region, snake species should present ovulation synchronous to copulation, but it was not observed for *C. durissus*. This species showed a female reproductive cycle phyllogenetically conserved among Viperidae lineage. Phylogenetic relationships are the main influencing factor for natural history characteristics for other Squamata species as well (James & Shine, 1985; 1988; Vitt, 1992).

On the other hand, NE and SE *C. durissus* populations show significative differences in male reproductive cycles which are probably related to different climatic conditions among the areas. Male snakes of genus *Crotalus* from temperate areas (Saint-Girons, 1982; Aldridge & Duvall, 2002) and *C. durissus* from SE (Salomão & Almeida-Santos, 2002) present post-nupcial, dissociated or type I reproductive cycle according to the classification proposed by Saint-Girons (1982): spermatogenesis occurs in the warmer season and spermatozoa are stored throughout the winter in the deferent ducts or in the females reproductive tract. Histological analyses showed that testicular regression occurred in autumn and winter (colder seasons), while spermatogenesis began in spring and reached its peak in summer (warmer season) in males of SE population (Salomão & Almeida-Santos, 2002). Then, sperm is stored

by males in the deferent ducts until mating occurs in the autumn (when testes are inactive) and after copulation, by females throughout the winter in the uterus, until ovulation occurs in spring in SE population (Almeida-Santos et al., 2004b; Almeida-Santos & Salomão, 1997).

The process of spermatogenesis is apparently under the control of body temperature (Aldridge & Duvall, 2002). Thus, maintenance of high temperatures throughout the year in NE region would allow males to conduct spermatogenesis at any time of the year. Our results show that testicular regression occurs in the spring, while spermatogenesis begins in summer and reaches its peak during autumn in NE males, when small mammals are more abundant in a conserved caatinga area (Freitas et al., 2005) and simultaneously to male-male combat and probably to mating. Mating season coincides with spermatogenesis in some viperid snakes from temperate regions (e.g. *Vipera aspis*, *Vipera berus*, *Crotalus viridis viridis* and *Sistrurus miliaris*), but these events occur in the warmer seasons (spring or summer) in these regions (Saint-Girons, 1982; Aldridge & Duvall, 2002).

Although sperm storage in the female reproductive tract throughout the winter is obligatory in NE population to synchronize male and female reproductive cycles, male reproductive cycle may be classified as prenuptial, associated or type III according to Saint-Girons (1982) and Schuett (1992) because spermatogenesis is completed towards the end of mating period. Although spermatogenesis is seasonal in NE population, males would be ready to mate at any time of the year as sperm is present throughout the year in the deferent ducts. This confirms the hypothesis of Aldridge & Duvall (2002) that females determine the mating period and males have to adapt to it. Studies considering the sexual segment of the kidney (*cf.* Sever et al., 2008) and abdominal fat (*cf.* Santos & Llorente, 2004) should be conducted to verify if there are differential reproductive costs between SE and NE *C. durissus* populations as they present different male reproductive strategies. As there is no data available on spermatogenic cycles of other *C. durissus* populations, such studies should be conducted in other Brazilian populations from Central Brazil, isolated populations in savannas inside the Amazon Forest and Central America.

Although rainfall was an important variable in determining other snake species reproductive events, as *Liophis miliaris* in Brazil (Pizzatto & Marques, 2006) and *Tropidonophis mairii* in Australia (Brown & Shine, 2006), this factor does not seem to play a major role in *C. durissus* reproductive cycle. On the other hand, temperature variation across different regions in Brazil, especially the maintenance of high temperatures during autumn and winter in Northeastern region, may be a key factor to explain intraespecific variation and evolutionary plasticity in *Crotalus durissus* male reproductive cycles.

Acknowledgments

We thank V.J. Germano for his efficient technical assistance in laboratory work and Lilian R. B. Mariutti for the English review. Francisco L. Franco (IB), Jacques Delabie (CEPLAC) and Antonio J. Argôlo (MZUESC) allowed access to collections. This study is based on a Msc. Thesis undertaken by Verônica A. Barros, funded by FAPESP (2008/56169-5).

References

- Aldridge, R.D. & Duvall, D. (2002) Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. *Herpetological Monographs* 16, 1-25.
- Almeida-Santos, S.M. (2005) Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). PhD Thesis. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Almeida-Santos, S.M.; Abdalla, F.M.F.; Silveira, P.F.; Yamanouye, N.; Breno, M.C. & Salomão, M.G. (2004a) Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. *General and Comparative Endocrinology* 139, 143-150.
- Almeida-Santos, S.M.; Laporta-Ferreira, I.L.; Antoniazzi, M.M.; Jared, C. (2004b) Sperm-storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139 (A), 169-174.
- Almeida-Santos, S.M. & Salomão, M.G. (2002) Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In *Biology of the vipers*, 445-462. Höggren, M.; Schuett, G.W.; Greene, H. & Douglas, M.E. (eds). Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing.
- Almeida-Santos, S.M. & Salomão, M.G. (1997) Long-Term Sperm-storage in Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese Journal of Herpetology*, 17 (2), 46-52.

- Armstrong, B. L. & Murphy, J.B. (1979) *Natural history of Mexican rattlesnakes*. Lawrence: University of Kansas Press.
- Aubret, F.; Bonnet, X.; Shine, R. & Lourdais, O. (2002) Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). *Hormones and Behavior* 42, 135-147.
- Begon, M.; Townsend, C.R. & Harper, J.L. (2006) *Ecology: from individuals to ecosystems*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Bonnet X.; Bradshaw, S.D. & Shine, R. (1998) Capital versus income breeding: an ectothermic perspective. *Oikos* 83, 333–342.
- Bronikowski, A.M. & Arnold, S.J. (1999) The evolutionary ecology of life history variation in the garter snake *Thamnophis elegans*. *Ecology* 80 (7), 2314-2325.
- Brown, G.P. & Shine, R. (2006) Why do most tropical animals reproduce seasonally? Testing hypotheses on an Australian snake. *Ecology* 87 (1), 133-143.
- Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (2004) *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca and London: Cornell University Press.
- Cordeiro, C.L.S.; Hoge, A.R. & Sawaya, P. (1981) Criação de serpentes em cativeiro. *Revista Biotérios* 1, 25-30.
- Fall, M.W. & Jackson, W.B. (1998) A new era of vertebrate pest control? An introduction. *International Biodeterioration & Biodegradation* 42, 85-91.
- Freitas, R.R.; Rocha, P.L.B. & Simões-Lopes, P.C. (2005) Habitat structure and small mammals abundance in one semiarid landscape in the Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(1), 119-129.
- Gibbons, J.W. & Lovich, J.E. (1990) Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). *Herpetological Monographs* 4, 1-29.

Gibbons, J.W. & Semlitsch, R.D. (1987) Activity patterns. In *Snakes: ecology and evolutionary biology*. Seigel, R.A.; Collins, J.T. & Novak, S.S. (eds). New York: Macmillan Publishing Co.

Gosling, W.D. & Bush, M.A. (2005). A biogeographic comment on: Wüster et al. (2005) Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology* 14, 3615-3617.

Greene, H. W. (1997) *Snakes: The Evolution of Mystery in Nature*. Berkeley: University of California Press.

Hoge, A. R. (1965) Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). *Memórias do Instituto Butantan* 32, 109-184.

James, C. & Shine, R. (1985) The seasonal timing of reproduction: a tropical-temperate comparison in Australian lizards. *Oecologia* 67, 464-474.

James, C. & Shine, R. (1988) Life history strategies of Australian lizards: a comparison between the tropics and the temperate zone. *Oecologia* 75, 307-316.

Klauber, L.M. (1972) *Rattlesnakes: their life history, habitats and influence on mankind*. Berkeley: University of California Press.

Lira-da-Silva, R.M.; Casais-e-Silva, L.L.; Queiroz, I.B. & Nunes, T.B. (1994) Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I-Vivíparas. *Revista Brasileira de Zoologia* 11, 187-193.

Madsen, T. & Shine, R. (1993) Costs of reproduction in a population of European adders. *Oecologia* 94, 488-495.

Mares, M.A.; Willig, M.R.; Steilein, K.E. & Lacher Jr, T.E. (1981) The mammals of northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Annals of Carnegie Museum* 50, 81-137.

Marques, O.A.V.; Eterovic, A. & Endo, W. (2001) Seasonal activity of snakes in the Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 22, 103-111.

Murphy, R.W.; Fu, J.; Lathrop, A.; Feltham, J. V. & Kovac, V. (2002) Phylogeny of the rattlesnakes (*Crotalus* and *Sistrurus*) inferred from sequences of five mitochondrial DNA genes. In *Biology of the Vipers*, 69–92. Höggren, M.; Schuett, G.W.; Greene, H. & Douglas, M.E. (eds). Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing.

Olsson, M.; Madsen, T. & Shine, R. (1997) Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proceedings of the Royal Society of London* 264, 455–459.

Parkinson, C.L. (1999) Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia* 3, 576-586.

Pizzatto, L. & Marques, O.A.V. (2006) Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. *Herpetological Journal* 16, 353-362.

Place, A. J. & Abramson, C.I. (2004) A quantitative analysis of the ancestral area of rattlesnakes. *Journal of Herpetology* 38, 151-156.

Quijada-Mascareñas, J.A.; Ferguson, J.E.; Pook, C.E.; Salomão, M.G.; Thorpe, R.S. & Wüster, W. (2007) Phylogeographic patterns of Trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: The Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. *Journal of Biogeography* 34: 1296–1312.

Saint-Girons, H. (1982) Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica* 38, 5-16.

Salomão, M.G. & Almeida-Santos, S. M. (2002) The reproductive cycle of Male Neotropical Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). In *Biology of the Vipers*, 507-514. Höggren, M.; Schuett, G.W.; Greene, H. & Douglas, M.E. (eds). Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing.

- Salomão, M.G.; Almeida-Santos, S.M. & Puerto, G. (1995) Activity pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): Feeding, Reproduction and Snakebite. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30, 101 -106.
- Santos, X. & Llorente, G.A. (2004) Lipid dynamics in the viperine snake, *Natrix maura*, from the Ebro Delta (NE Spain). *Oikos* 105, 132-140.
- Santos S.M.A.; Laporta- Ferreira I.L. & Puerto, G. (1990) Ritual de combate em *Crotalus durissus* - Serpentes - Viperidae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 62, 418.
- Schuett, G.W. (1992) Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In *Biology of the Pitvipers*, 169-184. Campbell, J. A. & Brodie, E. D. (eds.). Tyller: Selva.
- Seigel, R.A.; Huggins, M.M. & Ford, N.B. (1987) Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes. *Oecologia* 73, 481-485.
- Sever, D.M.; Siegel, D.S.; Baguill, A.; Eckstut, M.E.; Alexander, L.; Camus, A. & Morgan, C. (2008) Renal sexual segment of the cottonmouth snake, *Agkistrodon piscivorous* (Reptilia, Squamata, Viperidae). *Journal of Morphology* 269, 640-653.
- Shine, R. (1994) Sexual Size Dimorphism in Snakes Revisited. *Copeia*, 2, 325-346.
- Shine, R. (1980) Costs of reproduction in reptiles. *Oecologia* 46, 92-100.
- Shine, R. (1978) Sexual size dimorphism and male combat in snakes. *Oecologia* 33, 269-278.
- Solórzano, A. & Cerdas, L. (1988) Biología reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 36, 221-226.
- Vanzolini, P.E.; Ramos-Costa, A.M.M. & Vitt, L.J. (1980) *Répteis das caatingas*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.

Vitt, L.J. (1992) Diversity of reproductive strategies among Brazilian lizards and snakes: the significance of lineage and adaptation. In *Reproductive Biology of South American Vertebrates*, 135-149. Hamlett, W. C. (ed.) Springer-Verlag: New York.

Wüster, W.; Ferguson, J.E; Quijada-Mascareñas, J.A.; Pook, C.E.; Salomão, M.G. & Thorpe, R.S. (2005) Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology* 14, 1095-1108.

Zar, J. H. (1999) *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall International Inc.

Capítulo II

Biologia reprodutiva de *Bothrops leucurus* da Floresta Atlântica do Brasil

Artigo para submissão - Journal of Herpetology

Resumo

A biologia reprodutiva de *Bothrops leucurus*, dos estados da Bahia e Espírito Santo no Brasil, é descrita com base em análises macroscópicas e microscópicas das gônadas e vias genitais. Machos alcançam a maturidade sexual a partir de 500 mm e fêmeas a partir de 555 mm de comprimento rostro-cloacal (CRC). Não há diferença significativa em relação ao CRC de machos e fêmeas sexualmente maduros. As fêmeas apresentam ciclo reprodutivo sazonal: folículos vitelogênicos foram encontrados de fevereiro a novembro (do verão até a primavera) e embriões nos ovidutos de setembro a janeiro (final do inverno até o verão). O tamanho da ninhada (3 a 29 filhotes) é positivamente correlacionado com o CRC da mãe. Espermatozoides estocados no útero de fêmeas por meio de uma contração muscular uterina (UMT – “uterine muscular twisting”) foram encontrados durante o inverno. Os ciclos reprodutivos das fêmeas de *B. leucurus* e outras espécies do grupo *B. atrox* apresentam variação temporal na ocorrência de alguns eventos reprodutivos (e.g. vitelogênese, ovulação, nascimento dos filhotes) em relação ao padrão proposto para o gênero. Os machos apresentam ciclo reprodutivo sazonal. O epitélio germinativo do testículo permanece inativo durante o inverno e a primavera. A espermatogênese tem início no verão e atinge um pico no outono durante a estação reprodutiva, o que permite classificar o ciclo como pré-nupcial ou associado. O epitélio do ducto deferente apresenta adaptações para a estocagem de espermatozoides somente nas estações em que o espermatozoide é produzido no testículo (verão e outono).

Introdução

Variáveis ambientais como temperatura, umidade e disponibilidade de alimento sempre foram apontadas como sendo determinantes sobre o ciclo reprodutivo dos répteis (Fitch, 1982). Por isso, alguns autores sugeriam que os ciclos reprodutivos de serpentes da região tropical deveriam ser contínuos em função das condições climáticas (altas temperaturas) e grande disponibilidade de presas nos ecossistemas tropicais (Fitch, 1982; Vitt, 1983; Seigel & Ford, 1987). Porém, estudos sobre a biologia reprodutiva de serpentes da região tropical (principalmente Brasil e Austrália) revelaram que muitas espécies apresentam ciclos sazonais (Marques, 1996; Almeida-Santos & Salomão, 2002; Brown & Shine, 2006; Pizzatto et al., 2007). Uma explicação possível para a existência de ciclos reprodutivos sazonais nos trópicos é que esta seja uma característica conservada em algumas linhagens filogenéticas de serpentes (Vitt, 1992; Marques, 1996). Almeida-Santos & Salomão (2002)

apresentaram a hipótese de que o gênero *Bothrops* possua um padrão reprodutivo ancestral conservado ao longo das linhagens filogenéticas do gênero na América do Sul.

Bothrops leucurus é uma serpente da Família Viperidae que se encontra distribuída na região costeira dos estados do Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Alagoas e Ceará, onde primariamente predominava a Mata Atlântica (Campbell & Lamar, 2004; Porto & Teixeira, 1995). *B. leucurus* pertence ao grupo *Bothrops atrox* (Wüster et al., 1999) e representa uma colonização de origem amazônica que teria ocorrido durante o Pleistoceno de acordo com Puerto et al. (2001). Informações pontuais sobre exemplares mantidos em cativeiro são os únicos dados sobre a biologia reprodutiva de *B. leucurus* disponíveis na literatura atualmente. Comportamentos de combate entre os machos e acasalamento foram observados durante o outono (Almeida-Santos & Salomão, 2002) e nascimentos ocorreram de dezembro (início do verão) a abril (início do outono) em cativeiro (Lira-da-Silva et al., 1994; Sant'anna et al., 2001).

O objetivo deste trabalho é apresentar aspectos da biologia reprodutiva de *B. leucurus* e discutir a influência das variáveis climáticas da região (e.g. temperatura e pluviosidade) e das relações filogenéticas sobre a determinação dos principais eventos reprodutivos nesta espécie. Para tanto, foram investigados aspectos morfológicos e anatômicos envolvendo a maturação gonadal e o dimorfismo sexual. Os ciclos reprodutivos (espermatogênico e vitelogênico) foram associados aos padrões de estocagem de esperma em machos e fêmeas. A existência de relação entre a atividade anual da espécie e os principais eventos reprodutivos também é discutida. Além disso, uma comparação preliminar com os padrões reprodutivos descritos para as outras espécies do grupo *B. atrox* na literatura é apresentada.

Material e Métodos

Foram examinados 320 exemplares de *Bothrops leucurus* (134 fêmeas adultas, 168 machos adultos e 18 jovens) depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (MZUESC), Coleção Zoológica Gregório Bondar (CZGB) and Coleção Herpetológica Alphonse Richard Hoge no Instituto Butantan (IB). As serpentes analisadas são provenientes da região costeira do Espírito Santo e Bahia no Brasil (12°01'N, 20°18'S, 38°55'L, 40°56'O). Originalmente esta área era coberta por Mata Atlântica, que hoje se encontra degradada em grande parte. Porém ainda restam fragmentos remanescentes e parte da floresta foi conservada pelo sistema do cultivo do cacau em cabruca (Argôlo, 2004). *B.*

leucurus pode ser encontrada em culturas agrícolas, pastos para gado, brejos e remanescentes de mata na região estudada (Ripa, 1997).

Para caracterizar o clima da região, foram construídos climatogramas de todos os municípios amostrados no programa DIVA-GIS 7.1.7, a partir da base de dados WorldClim (clima atual: 1950 – 2000), versão 1.3 de outubro de 2004, resolução de 10 minutos. Altas temperaturas são mantidas durante o ano todo na região, porém os índices de precipitação apresentam dois padrões: nas localidades do Espírito Santo e em alguns municípios da Bahia, as estações seca e chuvosa são bem marcadas (Fig.1A); enquanto em outras localidades da Bahia, os índices de pluviosidade permanecem altos e praticamente constantes ao longo do ano, ou seja, praticamente não há estação seca (Fig.1B). A temperatura varia de 12,2°C a 27,3°C nos meses mais frios do ano (junho, julho, agosto) e nos meses mais quentes (janeiro, fevereiro, março) de 17, 3°C a 31,7°C. A precipitação anual varia de 597 a 2290 mm³ de acordo com o município.

Análises preliminares (estatísticas e histológicas) considerando as populações do Espírito Santo e sul da Bahia (anteriormente designada *Bothrops pradoi*) e demais localidades da Bahia separadamente não apresentaram resultados diferentes de acordo com a região geográfica. Por isto, todos os dados são apresentados conjuntamente para caracterizar o ciclo da espécie.

Após o registro do comprimento rostro-cloacal com auxílio de fita métrica de acurácea de 10 mm, a dissecação ventral dos indivíduos foi realizada para exame das gônadas e vias genitais. Com auxílio de paquímetro digital (precisão 0,1 mm), os seguintes dados foram registrados para as fêmeas adultas: (1) diâmetro do maior folículo ovariano ou presença de embriões; (2) presença/ausência de contração muscular uterina (UMT – *uterine muscular twisting*) na porção distal do útero; (3) aspecto geral dos ovidutos (liso ou pregueado); (4) presença de corpo lúteo nos ovários; (5) estado de diferenciação da vagina (diferenciada ou indiferenciada). As fêmeas que apresentavam folículos em vitelogênese secundária ou embriões no oviduto, ovidutos pregueados, presença de corpo lúteo nos ovários e vaginas diferenciadas foram consideradas adultas (=sexualmente maduras). Fêmeas que não apresentaram nenhuma destas características foram consideradas jovens (=sexualmente imaturas).

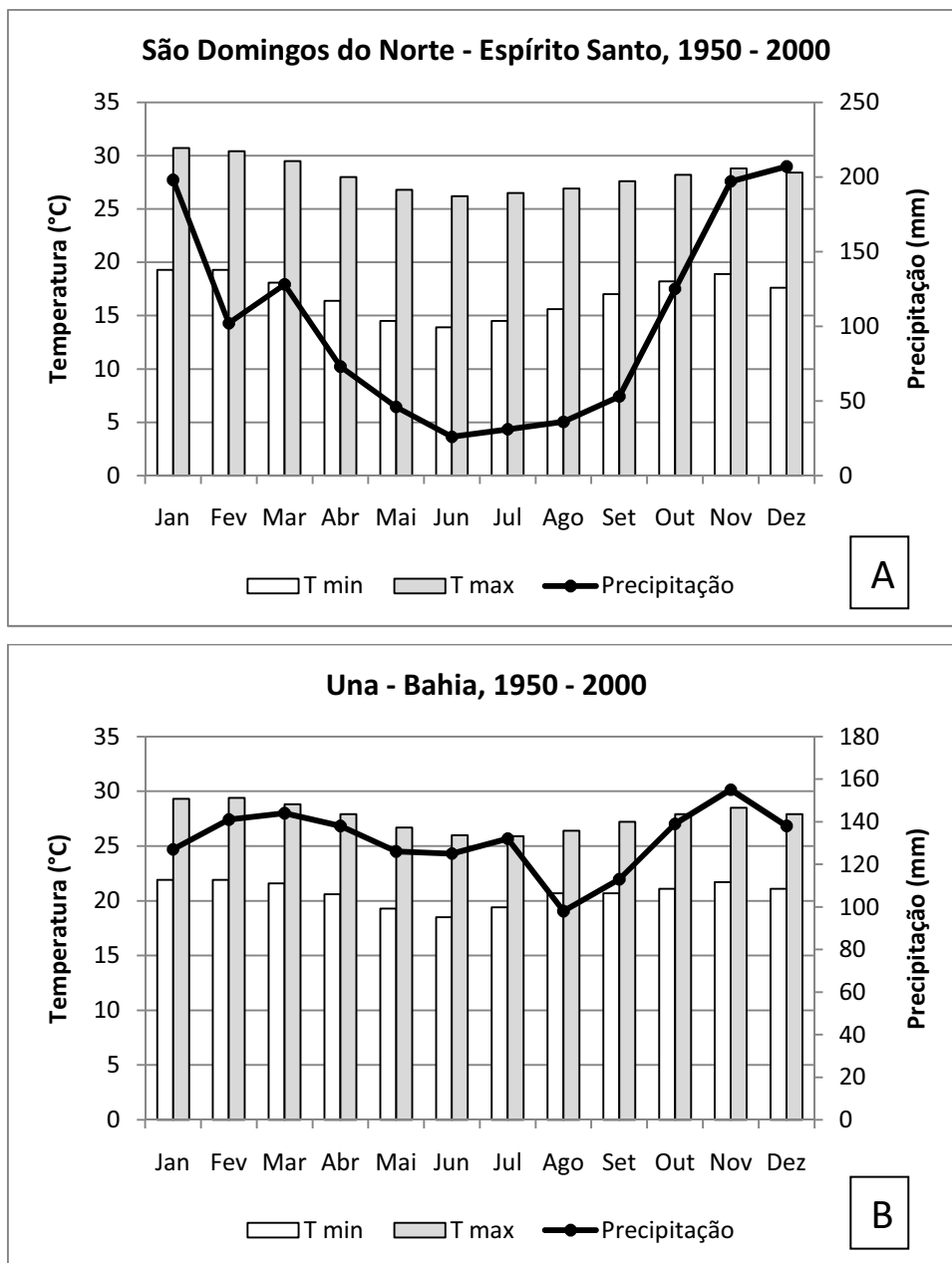


Fig.1. Padrões climáticos da região estudada. A. Com estação seca bem marcada. B. Sem estação seca bem definida.

Para os machos adultos foram registrados: (1) comprimento, largura e espessura dos testículos direito e esquerdo para determinar o volume testicular (VT) utilizando a fórmula para o volume da elipsóide ($VT = 4/3 \cdot \Pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde a = metade do comprimento, b = metade da largura, c = metade da espessura); (2) aspecto (liso/opaco/convoluto) e diâmetro dos ductos deferentes direito e esquerdo na sua porção mais alargada, na região distal próxima à região da cloaca. No caso de testículos com mais de um lobo, cada lobo teve suas medidas tomadas individualmente e o volume total do testículo corresponde à soma dos volumes dos lobos. A

presença de espermatozóides em análises histológicas dos testículos ou ductos deferentes foi utilizada como principal critério para a determinação da maturidade sexual nos machos. O aspecto opaco e convoluto dos ductos deferentes foi utilizado como critério na ausência de análises microscópicas disponíveis para o indivíduo.

O ciclo reprodutivo das fêmeas foi caracterizado pela distribuição do maior folículo ovariano ou presença de embriões nos ovidutos ao longo do ano. A porção distal do útero, na presença de UMT e folículos em vitelogênese secundária simultaneamente, foi coletada para análise histológica para verificar a existência de estocagem de esperma no trato reprodutivo das fêmeas.

As variações do volume testicular e do diâmetro dos ductos deferentes ao longo do ano foram combinadas com análises histológicas para descrever o ciclo reprodutivo dos machos. A correlação do volume dos testículos com o comprimento do corpo (CRC) foi testada por regressão simples. Para comparar o volume do testículo, foram realizados testes para as quatro estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) e também para a estação seca (outono + inverno) e chuvosa (primavera + verão), utilizando análise de covariância (ANCOVA), nas quais o CRC foi utilizado como co-variável. O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para verificar a existência de diferenças quanto ao diâmetro do ducto deferente entre as quatro estações do ano. As comparações entre as estações foram feitas pelo teste de Student-Newman-Keuls. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações sobre o diâmetro do ducto deferente entre as estações seca e chuvosa. Os testículos e a porção distal do ducto deferente dos machos foram processados para histologia para determinação do ciclo espermatogênico e avaliação de existência de estocagem de esperma nos ductos.

Todos os órgãos coletados para análises histológicas (útero, testículo e ducto deferentes) foram preservados em álcool a 70% e processados pelo método de parafina. Foram obtidos cortes de 5 µm de espessura e a coloração Hematoxilina-Eosina (H/E) foi utilizada para estudo dos tecidos.

O teste t de Student foi empregado para a análise de dimorfismo sexual quanto ao tamanho do corpo entre machos e fêmeas adultos. Além disso, o índice de dimorfismo sexual (SSD – *sexual size dimorphism*) foi calculado como $1 - (\text{média do CRC do maior sexo} / \text{média do CRC do menor sexo})$ de acordo com Gibbons & Lovich (1990) e Shine (1994). Por convenção, valores positivos correspondem a fêmeas maiores que machos e valores negativos a machos maiores que fêmeas (Shine, 1994).

A atividade das serpentes foi inferida por meio da comparação do número de indivíduos de cada sexo depositado nas coleções nas diferentes estações do ano (cf. Marques

et. al., 2001; Almeida-Santos & Salomão, 2002) utilizando o teste exato de Fisher para comparação par a par.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas Statistica (versão 7.0) e Bioestat (versão 5.00), assumindo $p < 0,05$ como critério de significância. As análises foram realizadas de acordo com Zar (1999). Na ausência de distribuição normal dos dados ou ocorrência de variâncias desiguais foram utilizados testes não-paramétricos.

Resultados

DIMORFISMO SEXUAL

O comprimento (CRC) dos machos sexualmente maduros variou de 500 a 1270 mm ($820,3 \pm 152,9$ mm). Já o CRC das fêmeas adultas variou de 555 a 1360 ($856,4 \pm 173,9$ mm). Não há diferença significativa quanto ao CRC entre machos e fêmeas adultos ($t = 1,71$, $p = 0,09$). O índice de dimorfismo sexual (SSD) encontrado foi $+ 0,02$.

CICLO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS

Fêmeas apresentando folículos em vitelogênese primária foram encontradas ao longo do ano todo. Folículos em vitelogênese secundária foram encontrados de fevereiro a novembro (do verão até a primavera). Embriões foram encontrados nos ovidutos de setembro a janeiro (do final do inverno até o verão) (Fig.2). Somente fêmeas provenientes da Bahia ovularam em setembro, no final do inverno. O tamanho da ninhada (número de embriões nos ovidutos) é positivamente correlacionado com o tamanho (CRC) da mãe ($R^2 = 0,47$; $p < 0,0001$). O número de embriões nos ovidutos variou de 3 a 29. Espermatozóides foram encontrados no interior das dobras da contração muscular uterina (UMT) em fêmeas apresentando folículos em vitelogênese secundária durante o inverno (Fig.3). Um resumo dos dados disponíveis na literatura sobre os eventos reprodutivos nas espécies do grupo *Bothrops atrox* é apresentado na Tabela 1.

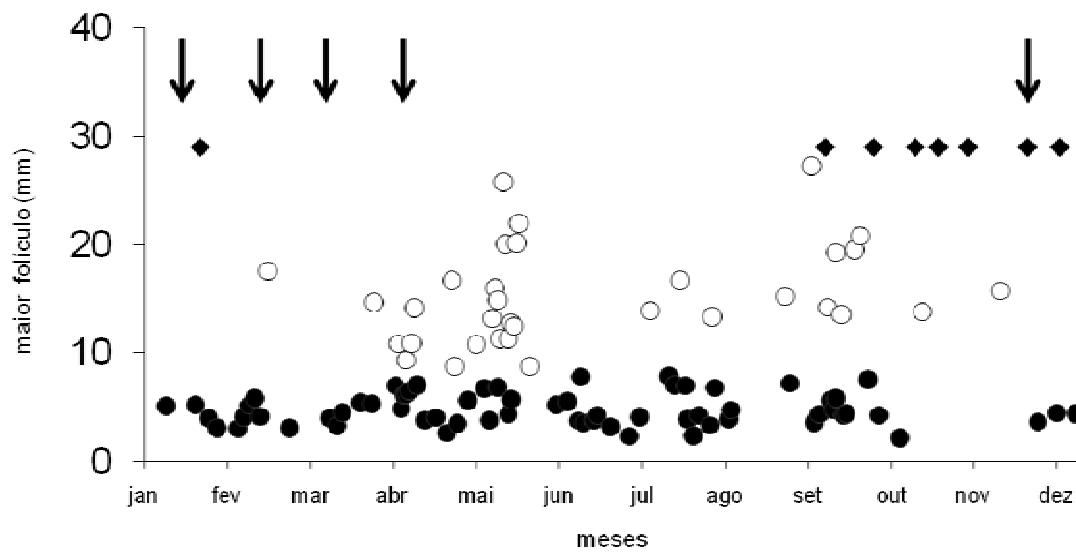


Fig.2. Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops leucurus* em relação à distribuição do maior folículo ovariano e presença de embriões no oviduto ao longo do ano. Círculos pretos = folículos em vitelogênese primária; círculos brancos = folículos em vitelogênese secundária; losangos = embriões nos ovidutos. As setas indicam a época de nascimento dos filhotes de acordo com Lira-da-Silva et al. (1994) e Sant'anna et al. (2001).

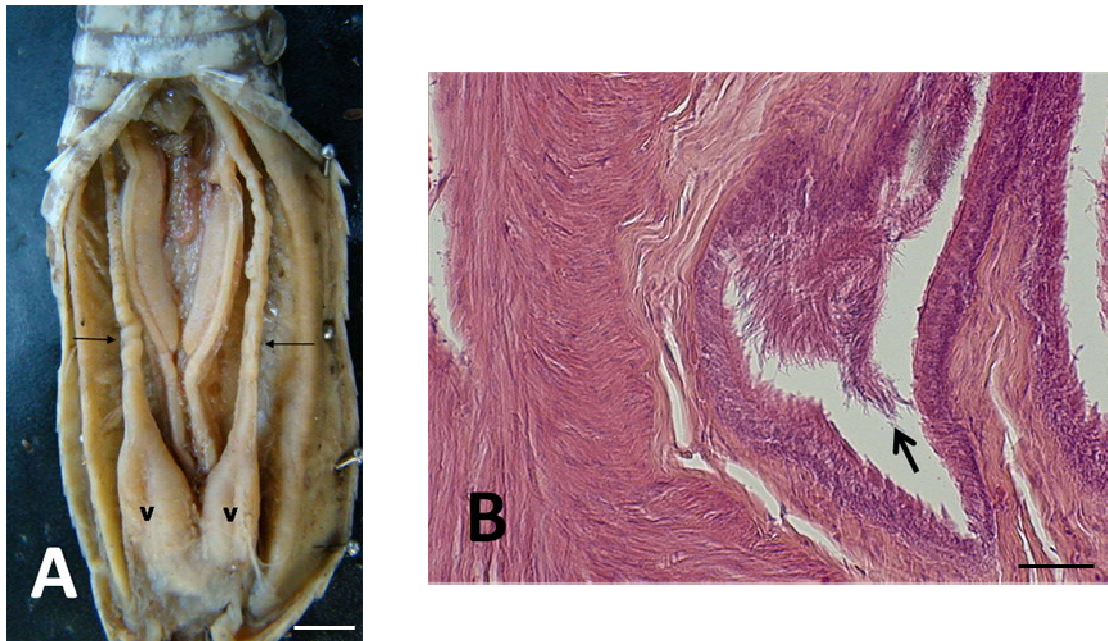


Fig.3. Contracção muscular uterina (UMT) em *Bothrops leucurus*. A. Aspecto macroscópico da região do útero e da vagina totalmente diferenciada (v). As setas indicam a região da contracção (UMT). Barra = 20 mm. B. Aspecto microscópico da UMT. A seta indica a presença de espermatozoides junto ao epitélio uterino. Barra = 100µm.

Tabela 1. Características da biologia reprodutiva de espécies do grupo *Bothrops atrox*.

Espécie	Dimorfismo sexual			Ciclo reprodutivo					Tamanho da ninhada (número de filhotes)	Autoridade
	CRC machos (mm)	CRC Fêmeas (mm)	SSD	Vitelogênese Secundária	Acasalamento	Combate Entre os machos	Presença de UMT	Nascimentos		
<i>Bothrops moojeni</i>	590 - 1060	760 – 1330	+ 0,25	Maio a julho	Abril e maio	Abril e maio	Sim	Outubro a Janeiro	03 a 32	Nogueira et al., 2003; Leloup, 1975; Almeida-Santos & Salomão, 2002
<i>Bothrops atrox</i>	467 - 1065	830-1532	+ 0,15	Março a junho	Abril a junho	Março e abril	Sim	Agosto a Fevereiro	05 a 57	Oliveira, 2003; Shine, 1994; Fitch, 1970; Almeida-Santos & Salomão, 2002
<i>Bothrops leucurus</i>	500 - 1270	555 – 1360	+ 0,02	Fevereiro a Novembro	Maio e junho	Maio	Sim	Dezembro a Abril	03 a 29	Este trabalho, Lira-da-Silva et al., 1994; Almeida-Santos & Salomão, 2002
<i>Bothrops asper</i> – P.A.	1000 - 1560	1000 – 2230	+ 0,33	Dezembro a Fevereiro	Março a Junho	Não observado	?	Setembro a Novembro	14 a 86	Solórzano & Cerdas, 1989; Sasa et al., 2009
<i>Bothrops asper</i> – P.P	1000 - 1640	1000 – 1930	+ 0,12	Outubro a Janeiro	Setembro a novembro	Não observado	?	Abril a Junho	05 a 40	Solórzano & Cerdas, 1989; Sasa et al., 2009

P.A. = População do Atlântico, P.P. = População do Pacífico

CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS

O volume dos testículos é positivamente correlacionado ao CRC ($F = 144,5204$; $r^2 = 0,4622$; $p < 0,0001$). Não há diferença significativa quanto ao volume do testículo entre as quatro estações do ano (ANCOVA, $F = 0,1044$; $p = 0,9565$), nem entre a estação seca e chuvosa (ANCOVA, $F = 0,0491$; $p = 0,9907$). Entretanto, análises histológicas demonstram que o ciclo espermatogênico de *B. leucurus* é sazonal. Durante o inverno ocorre a regressão total do epitélio germinativo testicular e o testículo continua em fase de quiescência durante a primavera. A espermatogênese tem início no verão e o pico de produção de espermatozóides ocorre no outono, quando o epitélio seminífero atinge a altura máxima observada (Fig.5).

O diâmetro do ducto deferente é maior na estação seca do que na chuvosa ($Z = 2,6786$; $p = 0,0074$). Considerando as quatro estações do ano, o diâmetro do ducto deferente é maior no inverno do que no verão ($H = 8,7797$; $p = 0,0324$). As análises histológicas indicam que espermatozóides estão presentes ao longo do ano todo nos ductos deferentes, embora no verão também possam ser encontrados ductos deferentes vazios em alguns indivíduos (Fig. 7.C.). O epitélio pseudoestratificado do ducto deferente encontra-se baixo e provavelmente não secretor durante a primavera. Durante o verão, o epitélio aumenta de tamanho e passa a apresentar dobras mesmo nos ductos deferentes vazios, preparando-se assim para estocar os espermatozóides que estão sendo produzidos nos testículos. Durante o outono o epitélio permanece com a presença de dobras. Já no inverno, não é mais possível visualizar a presença destas dobras do epitélio que se mantêm baixo e provavelmente não secretor durante esta estação apesar de apresentar o diâmetro aumentado.

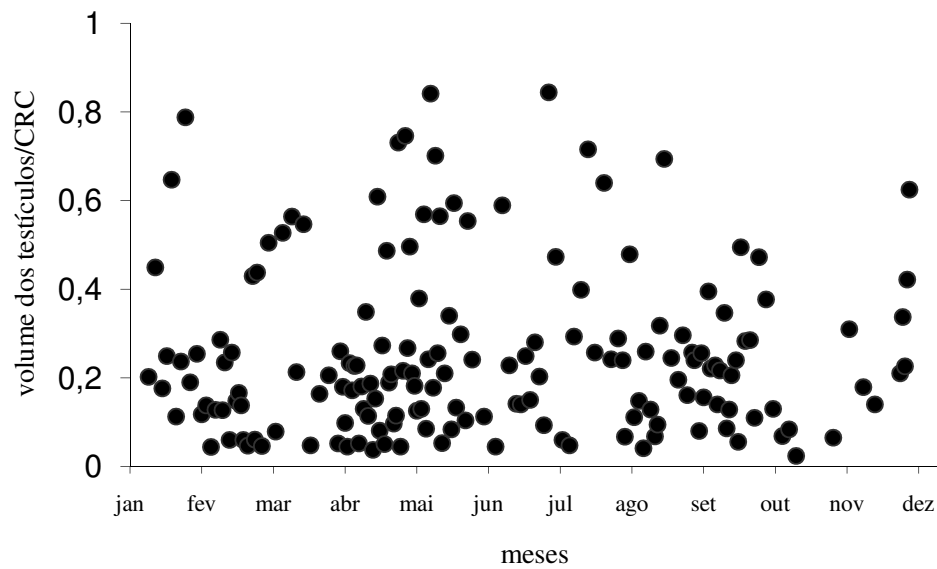


Fig.4. Ciclo testicular de *Bothrops leucurus* em relação ao volume relativo dos testículos (volume dos testículos/ CRC) ao longo do ano.

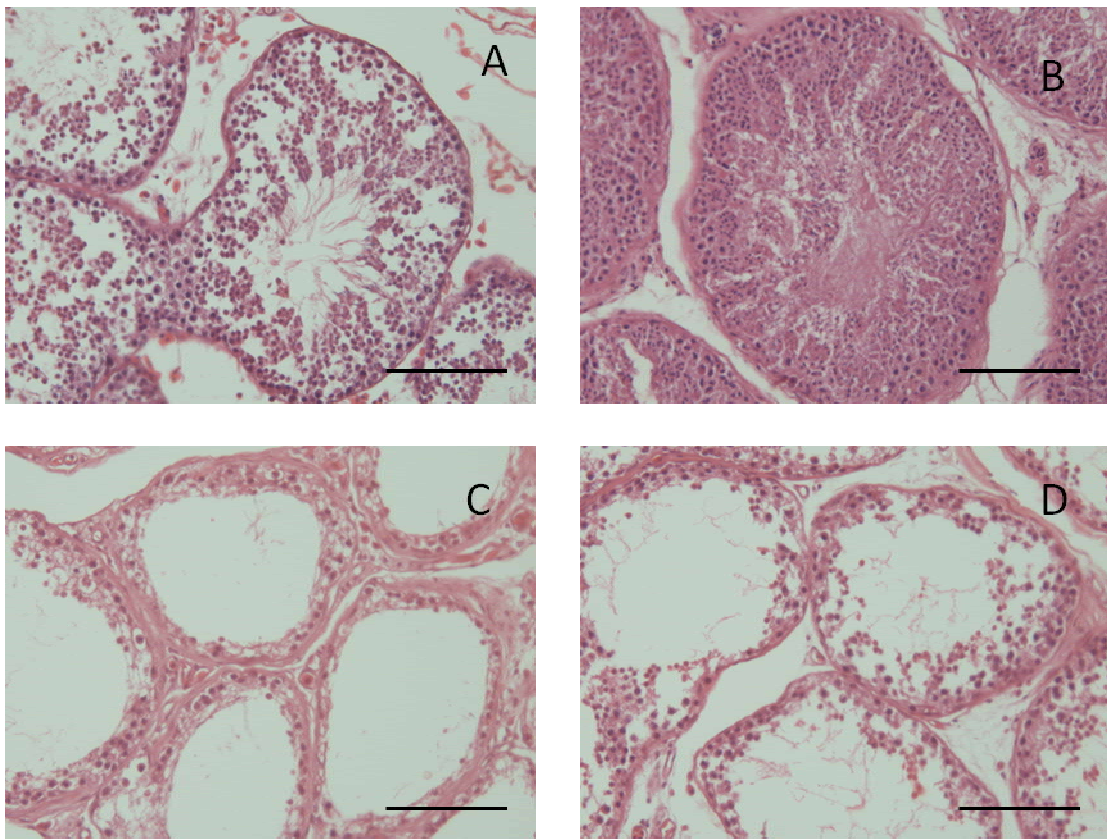


Fig. 5. Ciclo espermatogênico de *Bothrops leucurus*. A. Processo de espermatogênese em andamento no verão, com a presença de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos. B. Pico da espermatogênese durante o outono. C. Regressão do epitélio germinativo durante o inverno. D. Testículo em fase de quiescência durante a primavera. Barras = 100µm.

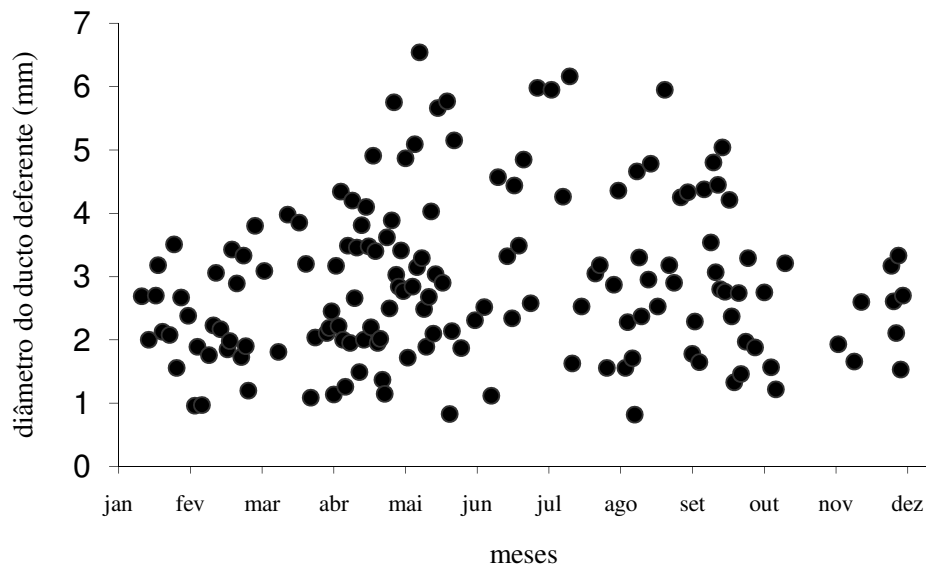


Fig. 6: Ciclo do ducto deferente de *Bothrops leucurus* em relação ao diâmetro do ducto deferente ao longo do ano.

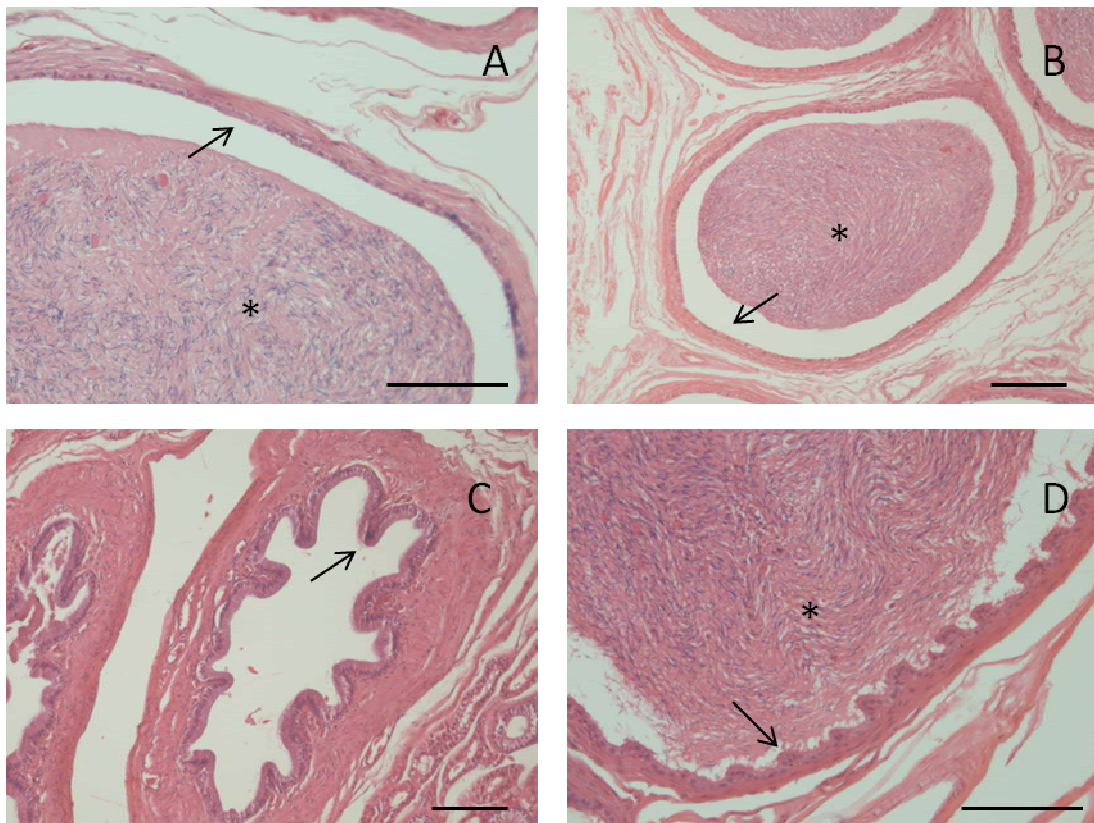


Fig. 7: Ciclo do ducto deferente de *B. leucurus* de acordo com análises microscópicas. A. Inverno: o epitélio pseudoestratificado do ducto está baixo. B. Primavera: o epitélio permanece baixo e não secretor. C. Verão: o epitélio aumenta de tamanho e apresenta dobras. D. Outono: Epitélio continua apresentando dobras. Os asteriscos indicam a presença de espermatozoides nos ductos e as setas apontam para o epitélio do ducto deferente. Barras = 100μm.

PADRÕES DE ATIVIDADE

Machos adultos foram mais abundantes no outono (estação seca) do que no verão e primavera (estação chuvosa) ($p < 0,05$). Além disso, machos foram mais abundantes no inverno (estação seca) do que na primavera (estação chuvosa) ($p < 0,05$). Fêmeas adultas foram mais comumente coletadas no outono e inverno (estação seca) do que na primavera e verão (estação chuvosa) ($p < 0,05$).

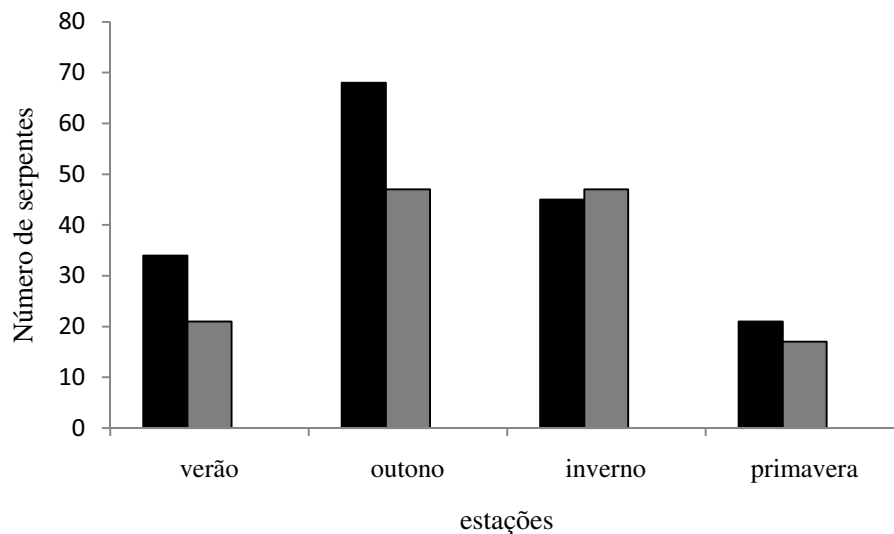


Fig. 8. Abundância de machos (barras pretas) e fêmeas (barras cinzas) adultos, depositados nas coleções visitadas, ao longo do ano.

Discussão

Bothrops leucurus e as demais espécies do grupo *B. atrox* apresentam uma característica intrigante em relação ao dimorfismo sexual. Geralmente, em espécies nas quais ocorre o combate entre os machos, os machos são maiores que as fêmeas e o índice de dimorfismo sexual de tamanho (SSD) apresenta valores negativos (Shine, 1994). Entretanto, nas espécies do grupo *B. atrox*, as fêmeas são maiores que os machos e os valores do SSD são positivos, apesar da existência de relato de combate para *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. atrox* (cf. Almeida-Santos & Salomão, 2002). Este padrão de dimorfismo sexual (fêmeas maiores que os machos) também ocorre nas demais espécies do gênero *Bothrops*, para as quais não há relato de combate entre os machos (Capítulo III, Hartmann et al., 2004; Almeida-Santos, 2005; Monteiro et al., 2006; Sazima & Manzani, 1998).

Os machos de *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. atrox* atingem a maturidade sexual com comprimento menor que as fêmeas (este trabalho, Nogueira et al., 2003; Oliveira, 2003). Na maioria das espécies de serpentes, as fêmeas alcançam a maturidade sexual com um comprimento maior que os machos, provavelmente porque deve existir uma relação entre o tamanho da fêmea e a fecundidade, ou seja, quanto maior a fêmea, maior o número de filhotes (Shine, 1994). Esta é uma vantagem da maturação tardia (e consequentemente com um tamanho maior) que ocorre em algumas serpentes da Família Viperidae (Saint Girons, 1957). De qualquer forma, há espécies de serpentes que não apresentam a relação “quanto maior a fêmea, maior o número de filhotes” (Seigel & Ford, 1987; Bonnet et al., 2000; 2003, Reading, 2004).

A maturidade tardia também é favorecida nos machos de *B. leucurus*, *B. atrox* e *B. moojeni*, pois o sucesso reprodutivo é influenciado pelo tamanho dos indivíduos (Stearns, 1976), uma vez que estas espécies apresentam comportamento de combate entre os machos (cf. Almeida-Santos & Salomão, 2002) e machos maiores tendem a vencer os combates e conseguir o acesso às fêmeas (Shine, 1978). As altas taxas de sobrevivência observadas para a maioria das espécies de viperídeos (Saint Girons, 1957) tornam possível o emprego da estratégia da maturação tardia (cf. Stearns, 1976 para uma revisão sobre história de vida). Shine (1980) atribui estas altas taxas de sobrevivência à estratégia de forrageamento passiva empregada pelos viperídeos (estratégia “senta e espera”) que reduz a exposição destas serpentes a predadores.

Por outro lado, podemos questionar porque algumas fêmeas pequenas tornam-se sexualmente maduras e produzem ninhadas pequenas de três ou cinco filhotes (veja Tabela 1). Dentre as teorias de história de vida, podemos encontrar algumas explicações possíveis para este fato. Estas fêmeas podem fazer parte de populações em crescimento, nas quais, a seleção age no sentido de favorecer o primeiro evento reprodutivo assim que este for fisiologicamente possível (Cole, 1954; Lewontin, 1965). Para Bonnet et al. (2000), a existência de fêmeas pequenas e reprodutivas em uma população pode indicar que existam táticas reprodutivas individuais e que o sucesso reprodutivo ao longo da vida de um indivíduo possa ser otimizado de diferentes formas por indivíduos diferentes em uma população de serpentes. A disponibilidade de presas no ambiente também pode afetar o tamanho da ninhada em serpentes como foi demonstrado pelos experimentos em cativeiro realizados por Ford & Seigel (1989) e Seigel & Ford (1991). Estes autores demonstraram que fêmeas de *Thamnophis marcianus* e *Elaphe guttata* que recebiam uma quantidade menor de presas produziam ninhadas menores em comparação com serpentes que recebiam uma dieta mais

calórica (Ford & Seigel, 1989; Seigel & Ford, 1991). Porém, a escassez de presas não parece ser uma explicação razoável para que fêmeas de *B. leucurus* produzam ninhadas pequenas, pois, teoricamente, em função da estabilidade climática de parte de sua área de ocorrência (Fig. 1.B.), deveria haver disponibilidade contínua de presas no ambiente (Alves et al., 2005). Nas localidades em que a estação seca e chuvosa são bem definidas (Fig. 1.A), a pluviosidade pode interferir na disponibilidade de anfíbios, um dos tipos de presa consumida principalmente pelos juvenis de *B. leucurus* (Martins et al., 2002). Uma vez que *B. leucurus* possui hábito alimentar generalista e seus principais tipos de presa são relativamente abundantes em seu habitat, incluindo os pequenos mamíferos que são as principais presas durante a fase adulta desta espécie (Martins et al., 2002), a escassez de presas provavelmente não ocorre também nas áreas com estação seca e chuvosa bem marcadas. De qualquer forma, para obter evidências que possam ser consideradas conclusivas são necessários estudos delineados para testar a possível influência da disponibilidade de alimento e de outras variáveis ambientais, como a pressão de predação, por exemplo, sobre o tamanho em que a maturidade sexual é atingida, bem como sobre o tamanho da ninhada e outras características do ciclo reprodutivo de *B. leucurus* e demais espécies do grupo *B. atrox*.

O ciclo reprodutivo das fêmeas de *B. leucurus* é sazonal, uma vez que tanto a ocorrência de embriões nos ovidutos (setembro a janeiro – final do inverno até o verão), quanto o nascimento dos filhotes (dezembro a abril – do verão ao início do outono, Lira-da-Silva et al., 1994) acontecem em períodos bem definidos do ano. Folículos em vitelogênese secundária são encontrados ao longo da maior parte do ano, em todas as estações (de fevereiro a novembro), porém esta não é uma boa evidência de que o ciclo das fêmeas seja contínuo, pois a velocidade de deposição do vitelo nos folículos pode variar de acordo com a condição corpórea da fêmea (ou seja, em função de suas reservas energéticas acumuladas antes da estação reprodutiva) e/ou com a disponibilidade de presas no ambiente (e seu consumo) no momento em que se dá a vitelogênese (Reading, 2004; Licht, 1984). Variações hormonais também podem interferir na taxa de deposição de vitelo nos folículos (Cree et al., 1991).

Almeida-Santos e Salomão (2002) propuseram a hipótese de que o padrão reprodutivo observado no gênero *Bothrops* representa a retenção de um padrão ancestral ao longo desta linhagem filogenética, de forma que as diferenças climáticas entre os ambientes ocupados pelas espécies atualmente não teriam um papel importante na determinação dos eventos reprodutivos nas espécies deste gênero. Corte, acasalamento e combate ocorreriam no outono (de abril a junho); vitelogênese e estocagem de esperma nas fêmeas por meio do UMT durante o outono e inverno (Julho a Setembro); fertilização na primavera (outubro a

dezembro) e, finalmente, o nascimento dos filhotes ocorreria na estação chuvosa, durante o verão (janeiro a março) (Almeida-Santos & Salomão, 2002). Porém, o ciclo reprodutivo de *B. leucurus*, assim como os ciclos de outras espécies do grupo *B. atrox* apresentam variações temporais em alguns eventos reprodutivos em relação ao que foi proposto por estas autoras como padrão para o gênero. *B. asper* apresenta variação interespecífica em relação aos eventos reprodutivos, com períodos de vitelogênese secundária e nascimento dos filhotes diferentes para populações isoladas por uma cadeia de montanhas na Costa Rica (Solórzano & Cerdas, 1989). Tais diferenças entre as populações são atribuídas às diferenças climáticas entre a região da Costa Rica voltada para o Oceano Pacífico (estação seca e chuvosa bem definidas) e a região voltada para o Oceano Atlântico (sem estação seca bem definida) (Solórzano & Cerdas, 1989). Embora grande parte dos dados sobre *B. atrox* seja proveniente de observações em cativeiro, os eventos reprodutivos parecem ocorrer em épocas diferentes dependendo da região da Amazônia (Central, Oriental ou Ocidental) (Cunha & Nascimento, 1981; Duellman, 1978; Fitch, 1970; Oliveira, 2003). Dados sobre indivíduos de *B. atrox* provenientes da natureza da região da Amazônia Central indicam que os eventos reprodutivos ocorram antecipadamente em relação ao padrão proposto para o gênero: o período da vitelogênese tem início em março e os filhotes nascem a partir de agosto, durante a estação seca (Oliveira, 2003) e não somente na estação chuvosa como foi proposto por Almeida-Santos & Salomão (2002). Em *B. moojeni* da região do cerrado, a ovulação também ocorre antecipadamente em relação ao padrão proposto (a partir de julho) (Nogueira et al., 2003). No entanto, diversos componentes do ciclo reprodutivo de *B. atrox*, *B. asper* e *B. moojeni* (e.g. ciclo espermatogênico, padrões de estocagem de esperma nas fêmeas e machos) ainda precisam ser estudados para que a biologia reprodutiva destas espécies possa ser compreendida e comparações mais precisas sobre as estratégias reprodutivas das espécies do grupo *B. atrox* possam ser elaboradas.

Em *B. leucurus*, além do período de deposição de vitelo nos folículos ocorrer durante praticamente o ano todo, a ovulação e fertilização dos folículos ocorre a partir de setembro (final do inverno), o que pode ser possível graças às altas temperaturas encontradas na região de ocorrência da espécie durante o ano todo, que possibilitam que o desenvolvimento embrionário possa ocorrer adequadamente mesmo no inverno (Vinegar, 1974). Além disso, apesar dos relatos de acasalamento para *B. leucurus* estarem dentro dos padrões propostos para o gênero (Almeida-Santos & Salomão, 2002), o ciclo do ducto deferente de *B. leucurus* sugere que o acasalamento e a cópula possam ocorrer também no inverno, uma vez que o diâmetro do ducto deferente apresenta-se tão elevado no inverno quanto no outono (época

conhecida da cópula) e diminui logo após o inverno, na primavera. O padrão de atividade anual de *B. leucurus* está intimamente relacionado aos eventos reprodutivos e fornece indícios de que a hipótese de que a época de acasalamento possa se estender do outono até o inverno possa ser verdadeira. Machos e fêmeas adultos são mais abundantes durante o outono (estação em que foi registrada a cópula) e o inverno, estação em que a cópula também poderia ocorrer de acordo com os dados apresentados. Estudos em campo são necessários para confirmar ou refutar esta hipótese. Outra razão possível para a coleta de muitas fêmeas durante o outono e o inverno seria a presença de fêmeas com folículos em vitelogênese secundária durante estas estações. O sobrepeso causado pelos folículos vitelogênicos dificultaria a locomoção e consequentemente, o comportamento de fuga das fêmeas (Seigel et al., 1987; Gibbons & Semlitsch, 1987; Salomão et al., 1995). De qualquer forma, fêmeas vitelogênicas de *B. leucurus* foram encontradas também em outras estações, o que enfraquece o uso deste argumento para esta espécie. Por outro lado, durante estas estações que apresentam temperaturas menores em relação aos demais períodos do ano, as fêmeas vitelogênicas poderiam passar mais tempo termorregulando (Seigel et al., 1987; Gibbons & Semlitsch, 1987; Salomão et al., 1995).

Os dados discutidos até esse ponto indicam que, embora estudos em campo e/ ou experimentos em laboratório delineados para testar a influência das variáveis ambientais (e.g. temperatura, pluviosidade e disponibilidade de presas) sobre a determinação de alguns eventos reprodutivos sejam necessários, parece haver alguma influência das variáveis ambientais sobre a determinação de alguns eventos reprodutivos, como a vitelogênese, ovulação e época de nascimento dos filhotes, nas espécies do grupo *B. atrox*, em função dos diferentes períodos de ocorrência destes eventos em relação ao padrão proposto para o gênero por Almeida-Santos & Salomão (2002). Por outro lado, outras características do ciclo reprodutivo mostraram-se conservadas ao longo da linhagem filogenética como foi proposto pelas autoras. A hipótese de que a estocagem de esperma por meio da UMT nas fêmeas durante o inverno ocorra em todas as espécies do gênero *Bothrops* (Almeida-Santos & Salomão, 2002) foi corroborada para *Bothrops leucurus*, uma vez que espermatozóides foram encontrados no interior da UMT desta espécie. A cascavel neotropical, *Crotalus durissus*, também apresenta a estratégia de estocagem de esperma por meio da UMT (Almeida-Santos & Salomão, 1997; Capítulo I). Uma vez que a cópula e a fertilização são dissociadas nestas espécies, a estocagem de esperma é um evento obrigatório para o sucesso reprodutivo (Schuett, 1992; Almeida-Santos & Salomão, 1997; 2002).

Os machos de serpentes também podem apresentar ciclos reprodutivos dissociados, nos quais a produção de esperma não ocorre simultaneamente à cópula e os espermatozóides são estocados no ducto deferente até a estação reprodutiva. Este tipo de ciclo reprodutivo é classificado como Tipo I, dissociado ou pós-nupcial de acordo com a classificação de Saint-Girons (1982). *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* do Estado de São Paulo, região sudeste do Brasil, apresentam ciclo reprodutivo pós-nupcial, pois a cópula ocorre no outono e os espermatozóides são produzidos durante a estação anterior (Almeida-Santos, 2005; Salomão & Almeida-Santos, 2002). *Bothrops erythromelas*, da região das caatingas do Nordeste do Brasil também apresenta ciclo reprodutivo pós-nupcial, apesar das altas temperaturas encontradas durante o ano todo em sua região de ocorrência possibilitarem, teoricamente, a ocorrência de espermatogênese em qualquer época do ano (Capítulo III). Já o ciclo reprodutivo de *B. leucurus* pode ser classificado como associado, Tipo I ou pré-nupcial de acordo com a classificação de Saint-Girons (1982), pois o pico da espermatogênese ocorre no outono, na mesma estação em que foi relatada a ocorrência de cópula para a espécie. Os machos de *Crotalus durissus* da região das caatingas e *Bothrops insularis* da Ilha da Queimada Grande também apresentam ciclo reprodutivo pré-nupcial (Capítulo I; Kasperoviczus, 2009). Em *B. insularis*, o ciclo pré-nupcial parece estar relacionado à disponibilidade sazonal de presas (aves migratórias) na ilha (Kasperoviczus, 2009). Porém, este fator não parece ser tão relevante para a determinação do ciclo reprodutivo dos machos de *B. leucurus*, uma vez que esta espécie possui hábito alimentar generalista e seus principais tipos de presa são relativamente abundantes em seu habitat (Martins et al., 2002).

Espermatozóides podem ser encontrados em todas as estações do ano no ducto deferente de *B. leucurus*, porém o epitélio do ducto deferente apresenta modificações estruturais associadas à estocagem de esperma (epitélio mais alto e com a presença de dobras) somente durante o verão e outono, estações em que os espermatozóides estão sendo produzidos nos testículos. Estudos sobre a viabilidade dos espermatozóides contidos no interior dos ductos deferentes durante as estações em que o epitélio do ducto deferente se mantém baixo e provavelmente não secretor (inverno e primavera) podem contribuir tanto para a compreensão do ciclo reprodutivo desta espécie, como para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na estocagem de esperma. Por exemplo, quais seriam os mecanismos de nutrição dos espermatozóides na ausência de secreção de substâncias pelo ducto deferente? Os dados apresentados aqui mostram que *B. leucurus* pode ser um bom modelo para estudos sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na estocagem de esperma nos machos de serpentes.

Os dados apresentados mostram que os ciclos reprodutivos dos machos das espécies de *Bothrops* parecem sofrer influência das condições ambientais locais, embora os dados disponíveis até o momento ainda não sejam suficientes para determinar qual fator (temperatura, pluviosidade, disponibilidade de alimento) ou combinação de fatores teria maior influência sobre a época de ocorrência da espermatogênese e padrões de estocagem de esperma nos ductos deferentes.

A maior parte das informações sobre os ciclos reprodutivos dos machos de serpentes da região neotropical são inferidas a partir da variação de medidas morfométricas dos testículos e ductos deferentes ao longo do ano (e.g. Pizzatto & Marques, 2002; 2006; Pizzatto et al., 2008a,b), baseando-se na premissa de que maiores tamanhos testiculares estejam associados ao pico da espermatogênese em serpentes (Volsøe, 1944). Porém, análises histológicas demonstraram que os ciclos reprodutivos de *B. leucurus*, *B. erythromelas* (Capítulo III) e *B. insularis* (Kasperoviczus, 2009) são sazonais, embora não ocorra variação no volume do testículo ao longo do ano, ou seja, nestas espécies, o pico da espermatogênese não é representado por um aumento no tamanho testicular. Além disso, um estudo com *Crotalus scutulatus* mostrou que os testículos são maiores na época da regressão do epitélio testicular nesta espécie (Schuett, 2002). Isto indica que a ausência de variação do volume ou comprimento dos testículos ao longo das estações não significa necessariamente que a espécie apresente ciclo espermatogênico contínuo. Tal fato pode interferir na interpretação atual dada ao ciclo reprodutivo dos machos de várias espécies de serpentes neotropicals, principalmente em relação ao padrão de ocorrência de ciclos contínuos ou sazonais (para uma revisão veja Pizzatto et al., 2007). A inclusão de análises histológicas das gônadas e vias genitais dos machos de serpentes fornecerá dados importantes para a discussão sobre a existência (ou não) da influência de variáveis ambientais e/ ou da filogenia sobre o ciclo reprodutivo de *Bothrops* e outros grupos de serpentes.

Referências

- Almeida-Santos, S.M. 2005. Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Tese de doutorado não publicada. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Almeida-Santos, S. M., e Salomão, M. G. 1997. Long-term sperm storage in female neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). Japanese Journal of Herpetology 17: 46-52.
- Almeida-Santos, S. M., e Salomão, M. G. 2002. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., e Greene, H.W. (eds), Biology of the vipers, pp. 445-462. Eagle Publ. Mountain, Utah.
- Argôlo, A.J.S. 2004. As serpentes dos cacauais do sudeste da Bahia. Editus, Ilhéus, Bahia, Brasil.
- Alves, F.Q., Argôlo, A.J.S. e, Jim, J. 2005. Biologia reprodutiva de *Dipsas neivai* Amaral e *D.catesbyi* (Sentzen) (Serpentes, Colubridae) no sudeste da Bahia, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 22: 573-579.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., e Lourdais, O. 2000. Reproductive vs ecological advantages to larger body size in female snakes, *Vipera aspis*. Oikos 89:509-518.
- Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O. e, Naulleau, G. 2003. Measures of reproductive allometry are sensitive to sampling bias. Functional Ecology 17: 39-49.
- Brown, G.P. e Shine, R. 2006. Why do most tropical animals reproduce seasonally? Testing hypotheses on an Australian snake. Ecology 87: 133-143.
- Campbell, J.A. e Lamar, W.W. 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Cornell University Press, London.

Cole, L. C. 1954. The population consequences of life history phenomena. *The Quarterly Review of Biology* 29:103-137.

Cree, A., Guillette, L.J. Jr., Brown, M.A., Chambers, G. K., Cockrem, J. F. E Newton, J. D. 1991. Slow estradiol-induced vitellogenesis in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *Physiological Zoology* 64: 1234-1251.

Cunha, O.R. e Nascimento, F.P. 1981. Ofídios da Amazônia. XII – Observações sobre a viviparidade em ofídios do Pará e Maranhão (Ophidia, Aniliidae, Boidae, Colubridae e Viperidae). *Boletim do Museu Emílio Goeldi, série Zoologia* 109: 1-20.

Duellman, W.E. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous publication - University of Kansas, Museum of Natural History* 65: 1-352.

Fitch, H. 1970. Reproductive cycles of lizards and snakes. *Miscellaneous publication - University of Kansas, Museum of Natural History* 52: 1-247.

Fitch, H. 1982. Reproductive cycles in tropical reptiles. *Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas* 96:1-53.

Ford, N.B. e Seigel, R.A. 1989. Phenotypic plasticity in reproductive traits: evidence from a viviparous snake. *Ecology* 70:1768-1774.

Gibbons, J.W. & Semlitsch, R.D. 1987. Activity patterns. In Seigel, R.A.; Collins, J.T. & Novak, S.S. (eds). *Snakes: ecology and evolutionary biology*. Macmillan Publishing Co, New York.

Gibbons, J.W. e Lovich, J.E. 1990. Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). *Herpetological Monographs* 4:1-29.

Hartmann, M.T., Marques, O.A.V. e, Almeida-Santos, S.M. 2004. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). *Amphibia-Reptilia* 25:77-85.

Kasperoviczus, K.N. 2009. Biologia reprodutiva da jararaca ilha, *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo. Dissertação de mestrado não publicada. Universidade de São Paulo, Brasil.

Leloup, P. 1975. Observation sur la reproduction de *Bothrops moojeni* en captivité. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* 62: 173-201.

Lewontin, R. C. 1965. Selection for colonizing ability. In Baker, H.G. e Stebbins, G.L. (eds.), *The Genetics of Colonizing Species*, pp. 79-94. Academic Press, New York.

Licht, P. 1984. Reptiles. In G. E. Lamming (ed), *Marshall's physiology of reproduction*, pp. 206-282. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Lira-da-Silva, R.M., Casais-e-Siva, L.L., Queiroz, I.B., e Nunes, T.B. 1994. Contribuição à Biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I. Vivíparas. *Revista Brasileira de Zoologia* 11:187-193.

Marques, O.A.V. 1996. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic Forest of Brazil. *Amphibia-Reptilia* 17: 277-285.

Marques, O.A.V., Eterovic, A. e Endo, W. 2001. Seasonal activity of snakes in the Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 22: 103-111.

Martins, M., Marques, O.A.V. e, Sazima, I. 2002. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., e Greene, H.W. (eds), *Biology of the vipers*, pp. 307-328. Eagle Publ. Mountain, Utah.

Monteiro, C., Montgomery, C.E., Spina, F., Sawaya, R.J. e, Martins, M. 2006. Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops matogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. *Journal of Herpetology* 40:408-413.

Nogueira, C.; Sawaya, R.J. e, Martins, M. 2003. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni* in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 37:653-659.

Oliveira, M.E.E.S. 2003. História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (SERPENTES, VIPERIDAE). Tese de doutorado não publicada. Universidade do Estado de São Paulo, Brasil.

Pizzatto, L. and Marques, O. A.V. 2002. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) from southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 23: 495-504.

Pizzatto, L. e Marques, O.A.V. 2006. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. *Herpetological Journal*, 16: 353-362.

Pizzatto, L., Almeida-Santos, S.M. e, Marques, O.A.V. 2007. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In Nascimento, L.B. e Oliveira, M.E. (eds.), *Herpetologia no Brasil II*, pp. 201-211.. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Pizzatto, L., Cantor, M., Lima de Oliveira, J., Marques, O.A.V., Capovilla, V. e Martins, M. 2008a. Reproductive ecology of dipsadine snakes, with emphasis on South American species. *Herpetologica* 64: 168-179.

Pizzatto, L., Jordão, R. S. e Marques, O.A.V. 2008b. Overview of reproductive strategies in Xenodontini (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) with new data for *Xenodon newwiedii* and *Waglerophis merremii*. *Journal of Herpetology* 42: 153-162.

Porto, M. e Teixeira, D.M. 1995. Geographic distribution: *Bothrops leucurus* (White-tailed lancehead). *Herpetological Review* 26:156.

Puerto, G., Salomão, M.G., Theakston, R.D., Thorpe, R.S., Warrell, D.A. e Wüster, W. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology* 14:527-538.

Reading, C.J. 2004. The influence of body condition and prey availability on female breeding success in the smoothsnake (*Coronella austriaca* Laurenti). *Journal of Zoology* 264: 61-67.

Ripa, D. Range extension for *Bothrops leucurus*. 1997. *The Bulletin of the Chicago Herpetological Society* 32:25-26.

Saint-Girons, H. 1957. Le cycle sexual chez *Vipera aspis* dans l'ouest de la France. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique* 91:284-350.

Saint-Girons, H. 1982. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica* 38: 5-16.

Salomão, M.G. e Almeida-Santos, S.M. 2002. The reproductive cycle of Male Neotropical Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). In Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., e Greene, H.W. (eds), *Biology of the vipers*, pp. 507-514. Eagle Publ. Mountain, Utah.

Salomão, M.G., Almeida-Santos, S.M. e, Puerto, G. 1995. Activity pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): Feeding, Reproduction and Snakebite. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 101 -106.

Sant'Anna, S., Grego, K.W., e Fernandes, W. 2001. Natural history notes: *Bothrops leucurus* (white-tailed lancehead), reproduction. *Herpetological Review* 32:45-46.

Sasa, M., Wasko, D.K. e Lamar, W.W. 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon* 54: 904–922.

Sazima, I. e Manzani, P.R. 1998. *Bothrops fonscai* (Fonseca's Lancehead). Reproduction and size. *Herpetological Review* 29:102-103.

Schuett, G.W. 1992. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In Campbell, J.A. e Brodie, E.D. (eds.), *Biology of the Pitvipers*, pp. 169-184. Tyller, Selva.

Schuett, G.W., Carlisle, S.L., Holycross, A.T., O'Leile, J.K., Hardy, D.L., Van Kirk, E.A., Murdoch, W.J. 2002. 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., e Greene, H.W. (eds.), *Biology of the vipers*, pp. 515-532. Carmel, Eagle Mountain.

Seigel, R.A. e Ford, N.B. 1987. Reproductive ecology. In Seigel, R.A., Collins, J.T., e Novak, S.S. (eds.), *Snakes: ecology and evolutionary biology*, pp. 210-252. MacMillan Publishing Co, New York.

Seigel, R.A. e Ford, N.B. 1991. Phenotypic plasticity in the reproductive characteristics of an oviparous snake, *Elaphe guttata*: implications for life history studies. *Herpetologica* 47:301-307.

Seigel, R.A., Huggins, M.M. e Ford, N.B. 1987. Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes. *Oecologia* 73:481-485.

Shine, R. 1978. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. *Oecologia* 33: 269-277.

Shine, R. 1980. Ecology of the Australian Death Adder *Acanthophis antarcticus* (Elapidae): Evidence for Convergence with the Viperidae. *Herpetologica* 36: 281-289.

Shine, R. 1994. Sexual Size Dimorphism in Snakes Revisited. *Copeia* 2: 325-346.

Solórzano, A. e Cerdas, L. 1989. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. *Herpetologica* 45: 444-450.

Stearns, S.C. 1976. Life-history tactics: a review of the ideas. *The Quarterly Review of Biology*, 51: 3-47.

Vinegar, A. 1974. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development on snake embryos. *Herpetologica* 30: 72-74.

Vitt, L.J. 1983. Ecology of an anuran-eating guild of terrestrial tropical snakes. *Herpetologica* 39: 52-66.

Vitt, L.J. 1992. Diversity of reproductive strategies among Brazilian lizards and snakes: the significance of lineage and adaptation. In Hamlett, W.C. (ed.), *Reproductive Biology of South American Vertebrates*, pp. 135-149. Springer-Verlag, New York.

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

Wüster, W., Salomão, M. G., Puerto, G., Thorpe, R.S., Theakston, R.D., Warrell, D.A., Duckett, G.J. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the *Bothrops atrox* species complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia* 8: 135-144.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall International Inc, New Jersey.

Capítulo III

Estratégias reprodutivas de *Bothrops erythromelas* das caatingas do Brasil: maturação e dimorfismo sexual, ciclos reprodutivos e variação intrapopulacional do padrão de estocagem de esperma nos machos

Artigo para submissão - Amphibia-Reptilia

Resumo

A biologia reprodutiva de *Bothrops erythromelas* da região das caatingas do Nordeste do Brasil é descrita com base em análises macroscópicas e microscópicas das gônadas e vias genitais de exemplares depositados em coleção. Machos atingem a maturidade sexual a partir de 315 mm e fêmeas a partir de 370 mm de comprimento rostro-cloacal. Fêmeas adultas são maiores que os machos. A deposição de vitelo nos folículos das fêmeas ocorre durante grande parte do ano, porém embriões nos ovidutos (2 a 13) foram encontrados somente em outubro e novembro. Os filhotes nascem de novembro a janeiro. O ciclo reprodutivo dos machos é sazonal: a espermatogênese ocorre durante a estação chuvosa (verão), época em que grande parte das presas consumidas por esta espécie é mais abundante. O epitélio germinativo do testículo permanece em repouso durante toda estação seca (outono + inverno). Análises histológicas indicam que ocorra variação intrapopulacional em relação ao padrão de estocagem de esperma no ducto deferente dos machos, que pode ocorrer (1) do verão, quando os espermatozoides são produzidos, até o outono, quando acontece a cópula; ou (2) somente no outono.

Introdução

A fauna de répteis das caatingas é a melhor conhecida dentre todos os domínios morfoclimáticos do Brasil (Rodrigues, 2003). Cinquenta e duas espécies de serpentes foram registradas em regiões de caatinga semiárida (Rodrigues, 2003). Porém, dados sobre a biologia reprodutiva estão disponíveis para poucas destas espécies (veja Vitt, 1992 para uma revisão). As temperaturas elevadas que ocorrem ao longo do ano todo na região semiárida das caatingas (Mendonça & Danni-Oliveira, 2007) proporcionam, teoricamente, condições para que os machos de serpentes produzam espermatozoides ao longo do ano todo, ou seja apresentem um ciclo reprodutivo contínuo (Saint-Girons, 1982). A espermatogênese também pode ocorrer somente durante a estação de acasalamento como foi descrito para as populações de *Crotalus durissus* das caatingas (Capítulo I).

Por outro lado, os índices de pluviosidade diferem enormemente ao longo do ano e duas estações, seca e chuvosa, podem ser facilmente distinguidas na região semiárida das caatingas do Nordeste do Brasil (Mendonça & Danni-Oliveira, 2007). Esta sazonalidade das chuvas pode ter influência sobre populações de animais que são presas de serpentes, como os anfíbios anuros, o que por sua vez também pode influenciar a determinação dos eventos

reprodutivos nas espécies de serpentes (cf. Shine, 2003). As relações filogenéticas também exercem influência sobre a época de ocorrência dos eventos reprodutivos nos répteis Squamata (Vitt, 1992; James & Shine, 1985; 1988). Almeida-Santos & Salomão (2002) propõem a hipótese de que as serpentes do gênero *Bothrops* apresentem um padrão reprodutivo conservado ao longo desta linhagem filogenética, baseando-se principalmente nos eventos do ciclo reprodutivo das fêmeas e na época de ocorrência de comportamentos reprodutivos (corte, acasalamento e combate entre os machos) de várias espécies deste gênero. Quatro espécies da Família Viperidae ocorrem em simpatria na região das caatingas: *Bothrops erythromelas*, *Bothrops iglesi*, *Bothrops neuwiedii* e *Crotalus durissus* (Rodrigues, 2003). Dentre estas, apenas *C. durissus* teve seu ciclo reprodutivo descrito (Capítulo I). O objetivo deste trabalho é apresentar dados sobre a biologia reprodutiva de *B. erythromelas* da região semiárida das caatingas e discutir a possível influência das características climáticas da região e das relações de parentesco sobre a determinação dos eventos do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas desta espécie. Dados referentes à maturação e dimorfismo sexual, ciclos vitelogênico e espermatogênico e padrões de estocagem de esperma são apresentados.

Material e métodos

Foram examinados 239 exemplares de *Bothrops erythromelas* (108 fêmeas adultas, 85 machos adultos e 26 jovens) depositados na Coleção Herpetológica Alphonse Richard Hoge do Instituto Butantan (IB). As serpentes analisadas são provenientes dos Estados da Bahia, Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte da Região Nordeste do Brasil (03°41'N, 14°40'S, 35°54'L, 42°50'O). O domínio morfoclimático das caatingas, que ocorre exclusivamente no Brasil, ocupa este território. Áreas cultivadas e degradadas ocupam parte da região amostrada.

Para caracterizar o clima da região, foram construídos climatogramas de todos os municípios amostrados no programa DIVA-GIS 7.1.7, a partir da base de dados WorldClim (clima atual: 1950 – 2000), versão 1.3 de outubro de 2004, resolução de 10 minutos. Altas temperaturas são mantidas durante o ano todo na região. A sazonalidade da região é marcada pelas diferenças nos índices de precipitação, de forma que duas estações podem ser reconhecidas: a seca (outono + inverno) e a chuvosa (verão + primavera) (Fig.1). A temperatura varia de 13,3°C a 32,0°C nos meses mais frios do ano (julho e/ou agosto) e nos meses mais quentes (varia de outubro a fevereiro dependendo da localidade amostrada) de

16,6°C a 34,6°C. A precipitação anual varia de 424 a 978 mm³ de acordo com o município. Apenas uma localidade amostrada apresenta precipitação anual de 1402 mm³.

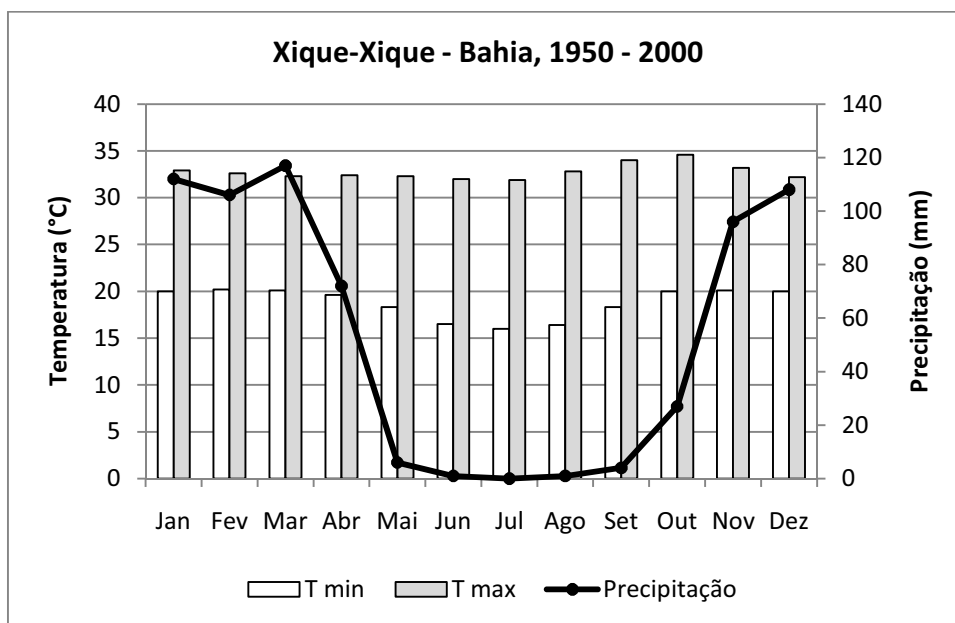


Fig.1. Padrão climático da região estudada.

Após o registro do comprimento rostro-cloacal com auxílio de fita métrica de acurácia de 10 mm, a dissecação ventral dos indivíduos foi realizada para exame das gônadas e vias genitais. Com auxílio de paquímetro digital (precisão 0,1 mm), os seguintes dados foram registrados para as fêmeas adultas: (1) diâmetro do maior folículo ovariano ou presença de embriões; (2) presença/ausência de contração muscular uterina (UMT – *uterine muscular twisting*) na porção distal do útero; (3) aspecto geral dos ovidutos (liso ou pregueado); (4) presença de corpo lúteo nos ovários; (5) estado de diferenciação da vagina (diferenciada ou indiferenciada). As fêmeas que apresentavam folículos em vitelogênese secundária ou embriões no oviduto, ovidutos pregueados, presença de corpo lúteo nos ovários e vaginas diferenciadas foram consideradas adultas (= sexualmente maduras). Fêmeas que não apresentaram nenhuma destas características foram consideradas jovens (= sexualmente imaturas).

Para os machos adultos foram registrados: (1) comprimento, largura e espessura dos testículos direito e esquerdo para determinar o volume testicular (VT) utilizando a fórmula para o volume da elipsóide ($VT = 4/3 \cdot \Pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde a = metade do comprimento, b = metade da largura, c = metade da espessura); (2) aspecto (liso/opaco/convoluto) e diâmetro dos ductos deferentes direito e esquerdo na sua porção mais alargada, na região distal próxima à região

da cloaca. A presença de espermatozóides em análises histológicas dos testículos ou ductos deferentes foi utilizada como principal critério para a determinação da maturidade sexual nos machos. O aspecto opaco e convoluto dos ductos deferentes foi utilizado como critério na ausência de análises microscópicas disponíveis para o indivíduo.

O ciclo reprodutivo das fêmeas foi caracterizado pela distribuição do maior folículo ovariano ou presença de embriões nos ovidutos ao longo do ano. As variações do volume testicular e do diâmetro dos ductos deferentes ao longo do ano foram combinadas com análises histológicas para descrever o ciclo reprodutivo dos machos. A correlação do volume dos testículos com o comprimento do corpo (CRC) foi testada por regressão simples. Uma comparação quanto às variações no volume do testículo entre a estação seca (outono + inverno) e chuvosa (primavera + verão) foi realizada utilizando análise de covariância (ANCOVA), nas quais o CRC foi utilizado como co-variável. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações sobre o diâmetro do ducto deferente entre as estações seca e chuvosa. Os testículos e a porção distal do ducto deferente dos machos foram processados para histologia para determinação do ciclo espermatogênico e avaliação de existência de estocagem de esperma nos ductos.

Os órgãos coletados para análises histológicas (testículo e ducto deferentes) foram preservados em álcool a 70% e processados pelo método de parafina. Foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura e a coloração Hematoxilina-Eosina (H/E) foi utilizada para estudo dos tecidos.

O teste de Mann-Whitney foi empregado para a análise de dimorfismo sexual quanto ao tamanho do corpo entre machos e fêmeas adultos. Além disso, o índice de dimorfismo sexual (SSD – *sexual size dimorphism*) foi calculado como $1 - (\text{média do CRC do maior sexo} / \text{média do CRC do menor sexo})$ de acordo com Gibbons & Lovich (1990) e Shine (1994). Por convenção, valores positivos correspondem a fêmeas maiores que machos e valores negativos a machos maiores que fêmeas (Shine, 1994).

A atividade das serpentes foi inferida por meio da comparação do número de indivíduos de cada sexo depositado na coleção nas diferentes estações do ano (cf. Marques et. al., 2001; Almeida-Santos & Salomão, 2002) utilizando o teste exato de Fisher para comparação par a par.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas Statistica (versão 7.0) e Bioestat (versão 5.00), assumindo $p < 0.05$ como critério de significância. As análises foram realizadas de acordo com Zar (1999). Na ausência de distribuição normal dos dados ou ocorrência de variâncias desiguais foram utilizados testes não-paramétricos.

Resultados

MATURIDADE E DIMORFISMO SEXUAL

Fêmeas podem atingir a maturidade sexual a partir de 370 mm de comprimento rostro-cloacal, e machos a partir de 315 mm. De qualquer forma, nem todos os indivíduos com CRC superior a estes são sexualmente maduros. Fêmeas adultas apresentam CRC médio de 541,6 mm (amplitude 370 – 920 mm) e machos adultos 440,4 mm (amplitude 315 – 645 mm). Fêmeas adultas de *B. erythromelas* são maiores que os machos adultos ($Z = 7,29$, $p < 0,0001$). O índice de dimorfismo sexual (SSD) é $+0,23$.

CICLO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS

Folículos em vitelogênese secundária foram observados em dois períodos: o primeiro, entre fevereiro e março, e o segundo entre junho e novembro. Embriões foram observados nos ovidutos entre outubro e novembro. Folículos em vitelogênese primária foram observados ao longo do ano todo (Fig.2). A contração muscular uterina (UMT) não foi macroscopicamente identificada em nenhuma fêmea adulta de *B. erythromelas*. O número de embriões nos ovidutos variou de 2 a 13. O comprimento rostro-cloacal médio dos filhotes de uma ninhada proveniente do Estado da Paraíba foi $157,8 \text{ mm} \pm 4,05$ ($N = 10$).

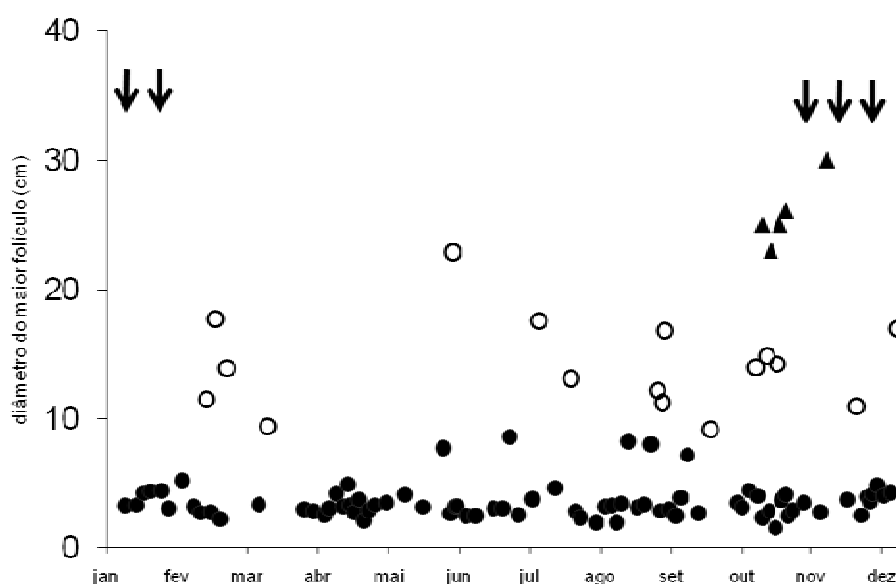


Fig.2. Ciclo reprodutivo das fêmeas: variação do diâmetro do maior folículo ovariano em fêmeas adultas de *Bothrops erythromelas* ao longo do ano. Círculos pretos = folículos em vitelogênese primária; círculos brancos = folículos em vitelogênese secundária; triângulos = embriões no oviduto. As setas indicam o período de nascimento dos filhotes de acordo com Lira-da-Silva et al. (1994) e Freitas (2003).

CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS

O volume dos testículos é positivamente correlacionado ao CRC ($F = 42,5864$; $r^2 = 0,3392$; $p < 0,0001$). Não há diferença significativa quanto ao volume do testículo entre a estação seca e chuvosa (ANCOVA, $F = 0,0125$; $p = 0,9075$) (Fig.3). Porém, análises histológicas demonstram que o ciclo espermatogênico de *B. erythromelas* é sazonal. Somente espermatogônias foram identificadas nos túbulos seminíferos durante o outono e inverno, ou seja, durante a estação seca o epitélio germinativo testicular permanece em repouso. A espermatogênese ocorre durante a estação chuvosa. Todos os tipos celulares da linhagem germinativa foram identificados nos túbulos seminíferos de animais coletados durante o verão (Fig.4).

Não há diferença quanto ao diâmetro dos ductos deferentes entre a estação seca e chuvosa ($Z = 0,4036$; $p = 0,6865$) (Fig.5). As análises histológicas indicam que ocorra variação intrapopulacional quanto ao padrão de estocagem de espermatozoides no ducto deferente em machos de *B. erythromelas*: dois machos provenientes do município de Guanambi na Bahia coletados em fevereiro apresentaram características do epitélio do ducto deferente totalmente divergentes (Fig.6). Um deles (IB 51415) apresenta ducto deferente com epitélio baixo e provavelmente não secretor, ou seja, o epitélio não apresenta modificações para a estocagem de espermatozoides contido no interior do ducto neste período. O ducto deferente do outro indivíduo (IB 53241) apresenta epitélio alto e com dobras, mudanças morfológicas indicativas de estocagem de espermatozoides. Durante o outono, o ducto deferente de todos os indivíduos amostrados apresentou epitélio alto e provavelmente secretor, enquanto no inverno o epitélio do ducto já se encontra baixo e provavelmente não secretor (Fig.6.)

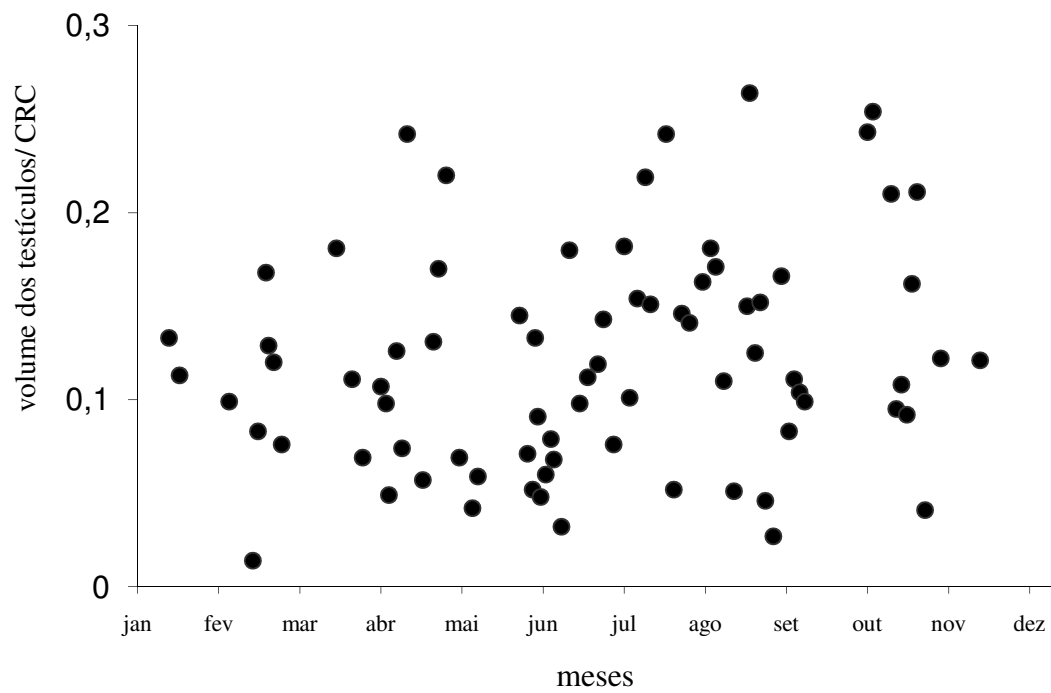


Fig. 3. Variação sazonal do volume relativo do testículo em *Bothrops erythromelas*.

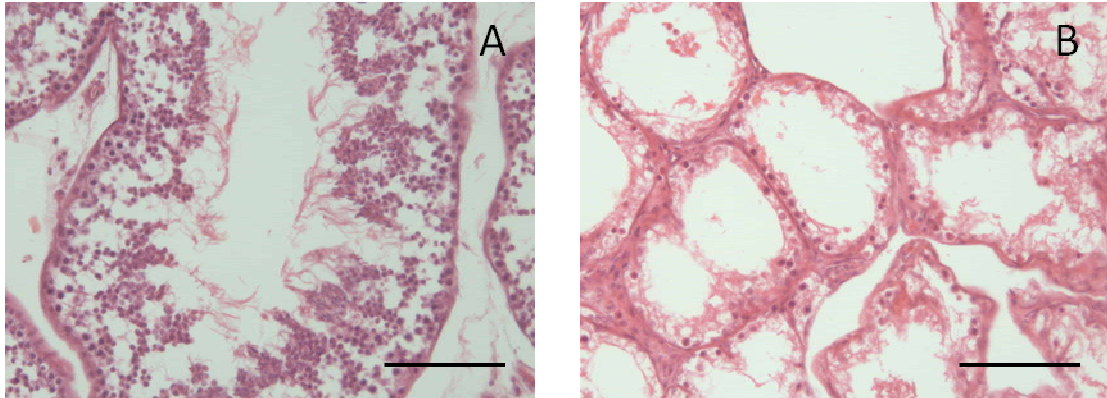


Fig. 4. Ciclo espermatogênico de *Bothrops erythromelas*. A. Espermatogênese completa durante a estação chuvosa (Fevereiro). Observe a presença de espermatozóides na luz do túbulo seminífero. B. Testículo em repouso durante a estação seca (Junho). Barras = 100µm.

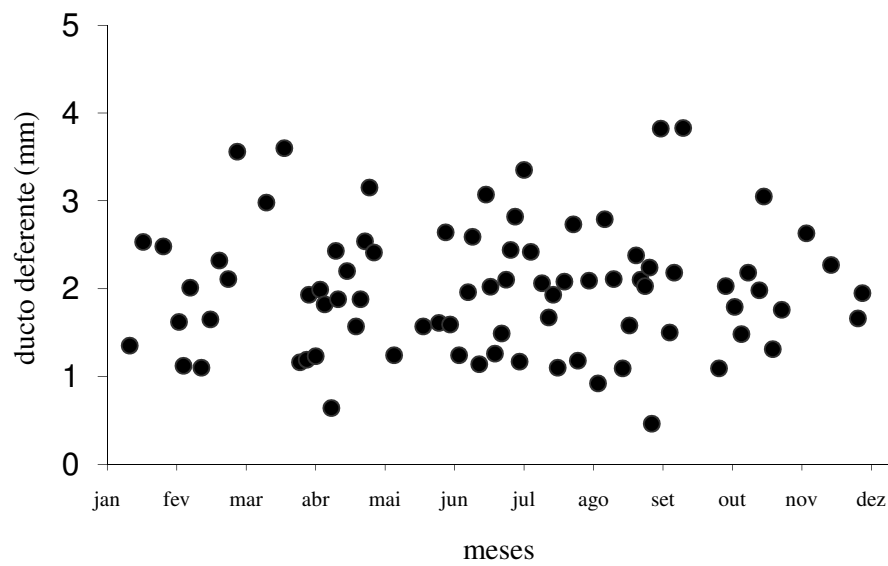


Fig. 5. Variação sazonal do diâmetro do ducto deferente em *Bothrops erythromelas*.

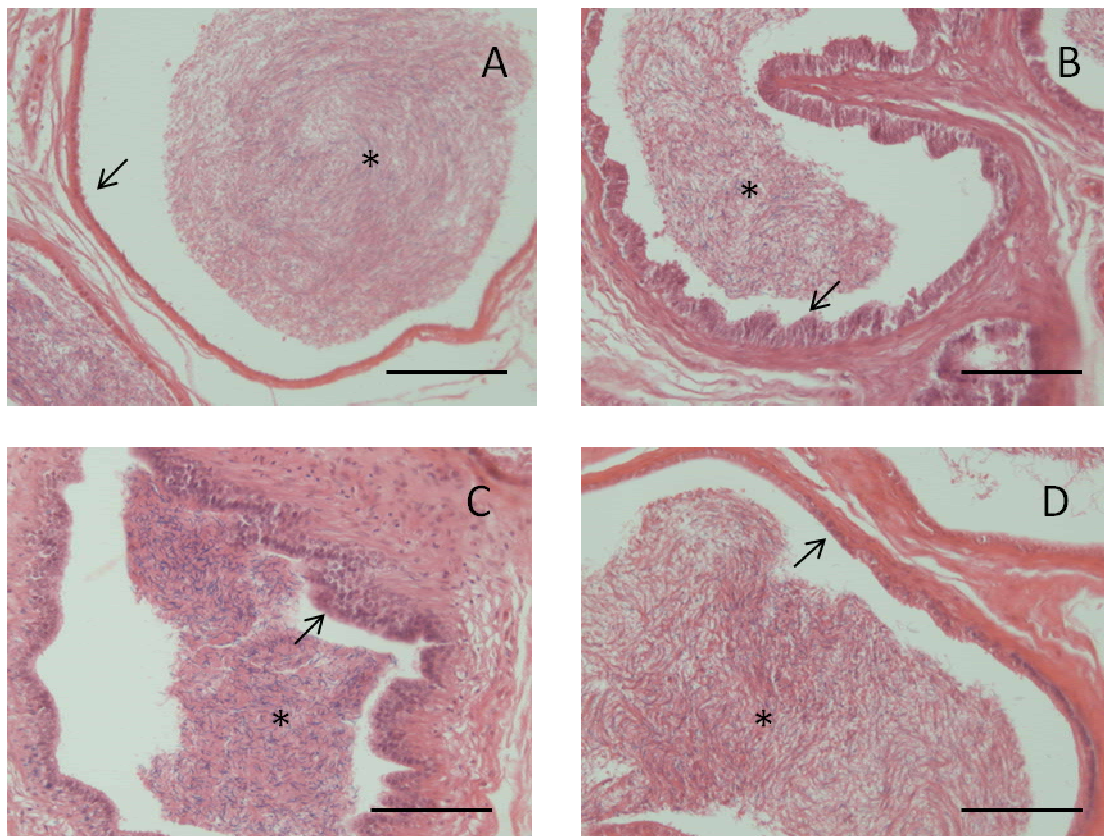


Fig. 6. Ciclo do ducto deferente de *Bothrops erythromelas* de acordo com análises microscópicas. A. Ducto deferente apresentando epitélio pseudoestratificado baixo e provavelmente não secretor em fevereiro (estação chuvosa/ verão). B. Epitélio do ducto deferente alto e com a presença de dobras, indicando estocagem de esperma em fevereiro (estação chuvosa/ verão). C. O epitélio se mantém alto e provavelmente secretor em junho (estação seca/ outono). D. No mês de julho (estação seca/ inverno) o epitélio está baixo e provavelmente não secretor. Os asteriscos indicam a presença de espermatozoides e as setas apontam para o epitélio do ducto deferente. Barras = 100 μ m.

PADRÕES DE ATIVIDADE

Machos sexualmente maduros foram mais abundantes no outono do que em todas as outras estações ($p < 0,05$). Fêmeas maduras foram mais abundantes no outono e verão do que no inverno ($p < 0,05$) (Fig.7).

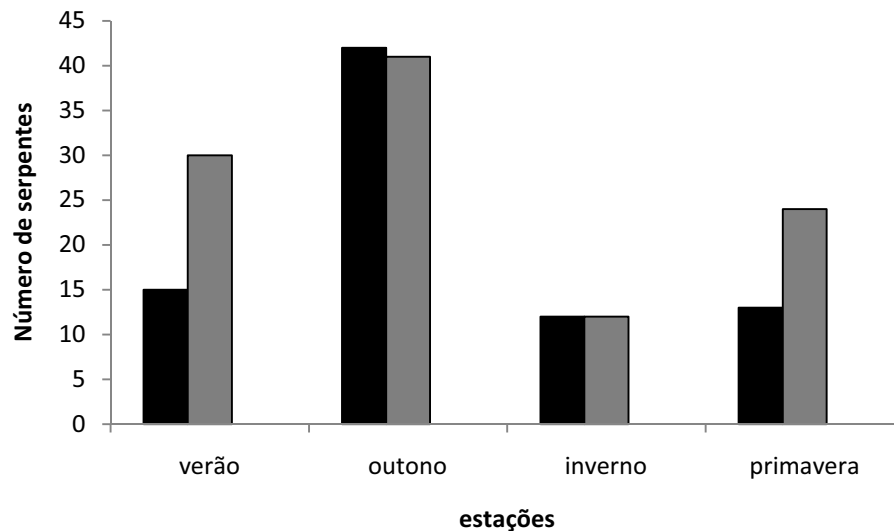


Fig. 7. Abundância de machos (barras pretas) e fêmeas (barras cinzas) de *Bothrops erythromelas* sexualmente maduros, depositados na coleção do Instituto Butantan, ao longo do ano.

Discussão

Os machos de *B. erythromelas* atingem a maturidade sexual com um tamanho corporal menor do que as fêmeas, assim como em diversas espécies de serpentes (Parker e Plummer, 1987), inclusive do gênero *Bothrops* (Capítulo II; Kasperoviczus, 2009; Monteiro et al., 2006; Hartmann et al., 2004; Nogueira et al., 2003). Fêmeas de serpentes podem apresentar maturação sexual tardia em relação aos machos coespecíficos, pois os custos reprodutivos das fêmeas com a produção da prole são mais altos e fêmeas maiores geralmente produzem ninhadas maiores (Seigel e Ford, 1987; Shine, 1994, mas veja Bonnet et al., 2000; 2003). Com relação ao dimorfismo sexual dos indivíduos sexualmente maduros, as fêmeas de *B. erythromelas* são maiores que os machos, assim como em outras espécies do gênero (Monteiro et al., 2006; Almeida-Santos, 2005; Hartmann et al., 2004; Nogueira et al., 2003). Este padrão de dimorfismo é o mais comum entre as serpentes e geralmente está correlacionado com a ausência de comportamento de combate entre os machos (Shine, 1978; Shine, 1994). Não há relato de combate para as espécies do grupo *B. neuwiedi* (Almeida-

Santos e Salomão, 2002) e nossos dados indicam que este comportamento também não ocorra em *B. erythromelas*. No gênero *Bothrops*, o combate parece ocorrer somente nas espécies do grupo *B. atrox* (Almeida-Santos e Salomão, 2002).

O ciclo reprodutivo das fêmeas de *B. erythromelas* é sazonal e a época de ocorrência dos eventos reprodutivos (e.g. cópula, ovulação/ fertilização e nascimento dos filhotes) apresenta um padrão conservativo em relação ao gênero *Bothrops* como foi proposto por Almeida-Santos e Salomão (2002). A vitelogênese ocorre durante grande parte do ano, assim como em *B. leucurus* (Capítulo II) e *B. pubescens* (Hartmann et al., 2004). A taxa de deposição do vitelo nos folículos pode variar entre os indivíduos de uma população de acordo com vários fatores, como por exemplo, níveis hormonais (cf. Cree et al., 1991) ou condição corpórea antes e/ou durante a estação reprodutiva (cf. Reading et al., 2004). Por isto, a duração da vitelogênese não é um bom indicador de que o ciclo das fêmeas seja sazonal ou contínuo.

Em *B. erythromelas*, a cópula (abril e maio – outono/estação seca, Almeida-Santos e Salomão, 2002) e a ovulação/fertilização (outubro e novembro – primavera/estação chuvosa) não são eventos sincrônicos. Por isto, espera-se que ocorra estocagem de esperma no trato reprodutivo das fêmeas durante o período compreendido entre estes eventos reprodutivos (Schuett, 1992; Almeida-Santos & Salomão, 2002). Porém, a contração muscular uterina (UMT), onde ocorre a estocagem de esperma no trato reprodutivo da fêmea durante o outono e inverno (estação seca) no gênero *Bothrops* (Almeida-Santos & Salomão, 2002; Capítulo II) e também na cascavel *Crotalus durissus* (Almeida-Santos & Salomão, 1997; Capítulo I), não foi identificada nas fêmeas de *B. erythromelas* examinadas neste estudo. Almeida-Santos e Salomão (2002) realizaram um estudo sobre a estocagem de esperma em 13 espécies do gênero *Bothrops*, incluindo espécies do grupo *B. neuwiedi*, e a UMT não foi encontrada somente em *B. erythromelas*. Desta forma, mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de que esta espécie apresente a estratégia de estocagem de esperma, principalmente porque a visualização da UMT em fêmeas de menor tamanho é mais difícil.

O padrão de atividade de machos e fêmeas sexualmente maduros de *B. erythromelas* também está relacionado à reprodução, como em outras espécies de serpentes (Almeida-Santos & Salomão, 2002; Capítulos I e II; cf. Pizzatto et al., 2007 para uma revisão). Machos e fêmeas são mais abundantes durante o outono, quando ocorre o acasalamento e a cópula (Almeida-Santos e Salomão, 2002). Os machos podem se deslocar mais durante o outono, procurando ativamente pelas fêmeas para o acasalamento, o que pode acarretar o aumento na incidência de coleta (Duvall et al., 1992; Almeida-Santos & Salomão, 2002; Capítulos I e II).

As fêmeas também são muito coletadas durante a primavera e o outono, provavelmente em função da maior quantidade de fêmeas vitelogênicas e ocorrência de gravidez durante estas estações. O aumento da massa corpórea durante estes eventos reprodutivos faz com que as fêmeas se locomovam mais vagarosamente e sejam mais facilmente coletadas (Shine, 1980a,b).

O tamanho da ninhada e o comprimento médio dos filhotes provenientes do Estado da Paraíba descritos neste trabalho são similares àqueles descritos em Lira-da-Silva et al. (1994) para uma ninhada da Bahia. A baixa fecundidade em *B. erythromelas* pode estar relacionada ao tamanho pequeno do corpo desta espécie, como ocorre com outras espécies do grupo *B. newwiedi* (Valdujo et al., 2002; Hartmann et al., 2004; Monteiro et al., 2006), com exceção de *B. mattogrossensis* do Pantanal brasileiro que pode ter ninhadas com até 37 filhotes (Monteiro et al., 2006).

O ciclo reprodutivo dos machos de *B. erythromelas* é sazonal. Esta característica do ciclo reprodutivo somente pode ser descoberta por meio de análises histológicas, como ocorre com outras espécies de serpentes (Capítulo II). A espermatogênese ocorre durante a estação chuvosa e os espermatozóides permanecem então estocados no ducto deferente até o momento da cópula que ocorre na estação seca (abril e maio – outono; Almeida-Santos e Salomão, 2002), quando o epitélio germinativo do testículo encontra-se inativo e o epitélio do ducto deferente encontra-se alto e secretivo. Tais características permitem classificar o ciclo reprodutivo dos machos como dissociado ou pós-nupcial de acordo com Saint-Girons (1982).

Machos de outras espécies de serpentes da Família Viperidae que também ocorrem na região Nordeste do Brasil (e.g. *Crotalus durissus* nas caatingas e *B. leucurus* na Mata Atlântica) apresentam ciclo reprodutivo associado ou pré-nupcial, nos quais a cópula ocorre simultaneamente à produção de espermatozóides (Capítulos I e II). As temperaturas encontram-se elevadas durante o ano todo nesta região do Brasil, o que possibilita, teoricamente, a ocorrência da espermatogênese em qualquer época do ano. Porém, a precipitação parece ser um fator determinante para o ciclo reprodutivo dos machos de *B. erythromelas*, uma vez que as populações de algumas presas desta espécie são afetadas pelo regime de chuvas. Centípedes, anfíbios anuros, lagartos e mamíferos fazem parte da dieta de *B. erythromelas* (Martins et al., 2002). Considerados em conjunto, centípedes e anuros correspondem a mais de 50% da dieta de *B. erythromelas* (Martins et al., 2002), e estes dois grupos são mais abundantes na estação chuvosa (Arzabe, 1999; Lewis, 1981), quando ocorre a produção de espermatozóides, do que na estação seca, quando o testículo está inativo. A espermatogênese pode ser considerada como um evento reprodutivo altamente custoso (cf.

Olsson et al., 1997) e os machos de *B. erythromelas* poderiam aumentar a frequência alimentar durante este período para suprir a demanda energética da produção de espermatozóides. Estudos envolvendo a sazonalidade da frequência alimentar nesta espécie podem contribuir para o entendimento desta questão.

As análises histológicas também foram fundamentais para a descrição do ciclo do ducto deferente e consequentemente dos padrões de estocagem de esperma nos machos de *B. erythromelas*. Neste trabalho apresentamos o primeiro relato de variação intrapopulacional envolvendo padrões de estocagem de esperma no ducto deferente de serpentes. Esta estratégia foi identificada na população de *B. erythromelas* do município de Guanambi na Bahia. As modificações estruturais do epitélio do ducto deferente para a estocagem de esperma podem ocorrer a partir do verão e persistir até o outono, ou ainda podem acontecer somente durante o outono, época em que ocorre a cópula (Almeida-Santos e Salomão, 2002). Como parte desta última estratégia reprodutiva, os espermatozóides produzidos durante o verão, poderiam então ficar estocados no epidídimo durante esta estação (cf. Shea, 2001) até que o ducto deferente apresente as modificações estruturais necessárias a estocagem de esperma no outono. O uso destas diferentes estratégias em uma população pode significar que para os machos também podem existir táticas reprodutivas individuais e que o sucesso reprodutivo ao longo da vida de cada indivíduo possa ser otimizado de diferentes formas, assim como foi proposto por Bonnet et al. (2000) em relação às estratégias reprodutivas das fêmeas de *Vipera aspis*. O gasto energético associado às mudanças estruturais do ducto deferente necessárias a estocagem de esperma provavelmente é maior para os indivíduos que apresentam ducto deferente com epitélio alto e dobrado durante o verão e o outono do que para aqueles indivíduos que apresentam estas modificações no epitélio apenas durante a estação reprodutiva (outono), o que acarretaria uma variação em relação aos custos reprodutivos dos machos nesta espécie. É importante que a viabilidade dos espermatozóides contidos no interior dos ductos deferentes que não apresentam as modificações estruturais associadas a estocagem de esperma, ou seja, que apresentem epitélio baixo e provavelmente não secretor, seja investigada para que as estratégias reprodutivas dos machos de *B. erythromelas* possam ser melhor compreendidas. Análises histológicas das gônadas e vias genitais de um número maior de machos desta espécie, provenientes de outras localidades ao longo de sua área de distribuição podem revelar outras estratégias reprodutivas do ciclo dos machos.

Referências

- Almeida-Santos, S.M. (2005): Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). PhD Thesis. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Almeida-Santos, S.M., Salomão, M.G. (2002): Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In Biology of the vipers, p. 445-462. Höggren, M., Schuett, G.W., Greene, H., Douglas, M.E., Eds., Eagle Mountain, Eagle Mountain Publishing.
- Almeida-Santos, S.M., Salomão, M.G. (1997): Long-Term Sperm-storage in Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). Jap. Jour. Herp. 17(2): 46-52.
- Arzabe, C. (1999): Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian caatinga. Revta. Bras. Zool. 16(3): 851-864.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., Lourdais, O. (2000): Reproductive vs ecological advantages to larger body size in female snakes, *Vipera aspis*. Oikos. 89: 509–518.
- Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O., Naulleau, G. (2003): Measures of reproductive allometry are sensitive to sampling bias. Funct. Ecol. 17: 39–49.
- Cree, A., Guillette, L.J.Jr., Brown, M.A., Chambers, G.K., Cockrem, J.F., Newton, J.D. (1991): Slow estradiol-induced vitellogenesis in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. Phys. Zool. 64: 1234-1251.
- Duvall, D., Arnold, S.J., Schuett, G.W. (1992): Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection and microevolution. In: Biology of the pitvipers, 1ª Edição, p. 321-336. Campbell, J.A., Brodie, E.D.Jr., Eds., Tyler, Selva.
- Freitas, M.A. (2003) Serpentes brasileiras. Bahia.

- Gibbons, J.W., Lovich, J.E. (1990): Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). Herp. Mono. 4: 1-29.
- Hartmann, M.T., Marques, O.A.V., Almeida-Santos, S.M. (2004): Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). Amph.-Rept. 25: 77-85.
- James, C., Shine, R. (1988): Life history strategies of Australian lizards: a comparison between the tropics and the temperate zone. Oecol. (Berlin). 75: 307-316.
- James, C., Shine, R. (1985): The seasonal timing of reproduction: a tropical-temperate comparison in Australian lizards. Oecol. (Berlin). 67: 464-474.
- Kasperoviczus, K.N. (2009): Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- Lewis, J.G.E. (2007): The biology of centipedes. Cambridge, Cambridge University Press.
- Lira-da-Silva, R.M., Casais-e-Silva, L.L., Queiroz, I.B., Nunes, T.B. (1994): Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I-Vivíparas. Revta. Bras. Zool. 11: 187-193.
- Marques, O.A.V., Eterovic, A., Endo, W. (2001): Seasonal activity of snakes in the Atlantic Forest in southeastern Brazil. Amph.-Rept. 22: 103-111.
- Martins, M., Marques, O.A.V., Sazima, I. (2002): Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Biology of the vipers, 1ª Edição, p.307- 328. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W., Eds., Utah, Eagle Publ. Mountain.
- Mendonça, F., Danni-Oliveira, I.M. (2007): Climatologia: noções básicas e climas do Brasil. São Paulo, Oficina de Textos.

Monteiro, C., Montgomery, C.E., Spina, F., Sawaya, R.J., Martins, M. (2006): Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops mattogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. Jour. Herp. 40: 408-413.

Nogueira, C., Sawaya, R.J., Martins, M. (2003): Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni* in the Brazilian Cerrado. Jour. Herp. 37: 653-659.

Olsson, M., Madsen, T., Shine, R. (1997): Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. Proc. Roy. Soc. Lond. 264: 455–459.

Parker, W.S., Plummer, M.V. (1987): Population ecology. In: Snakes: ecology and evolutionary biology, p. 253-301. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S., Eds., New York, MacMillan Publ Co.

Pizzatto, L., Almeida-Santos, S.M., Marques, O.A.V. (2007). Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: Herpetologia no Brasil II, p. 201-211. Nascimento, L.B., Oliveira, M.E., Eds., Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Herpetologia.

Reading, C.J. (2004): The influence of body condition and prey availability on female breeding success in the smoothsnake (*Coronella austriaca* Laurenti). Jour. Zool. (London) 264: 61-67.

Rodrigues, M. T. (2003): Herpetofauna da caatinga. In: Ecologia e conservação da caatinga, p.181-236. Leal, I.R., Tabarelli, M., Silva, J.M.C., Eds., Pernambuco, Editora Universitária da UFPE.

Saint-Girons, H. (1982): Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. Herpet. 38: 5-16.

Schuett, G.W. (1992): Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In Biology of the Pitvipers, p. 169-184. Campbell, J.A., Brodie, E.D., Eds. Tyller, Selva.

- Seigel, R.A., Ford, N.B. (1987): Reproductive ecology. In: Snakes: ecology and evolutionary biology, p. 210-252. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S., Eds., New York, MacMillan Publ Co.
- Shea, G.M. (2001): Spermatogenic Cycle, Sperm Storage, and Sertoli Cell Size in a Scolecophidian (*Ramphotyphlops nigrescens*) from Australia. Jour. Herp. 35: 85-91.
- Shine R. (2003): Reproductive strategies in snakes. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 270: 995-1004.
- Shine, R. (1994): Sexual Size Dimorphism in Snakes Revisited. Cop. 2: 325-346.
- Shine, R. (1980a): Comparative ecology of three Australian snake of the genus *Cacophis* (Serpentes, Colubridae). Cop. 831-838.
- Shine, R. (1980b): Costs of reproduction in reptiles. Oecol. 46: 92-100.
- Shine, R. (1978): Sexual size dimorphism and male combat in snakes. Oecol. 33: 269-278.
- Valdujo, P.H., Nogueira, C., Martins, M. (2002): Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. Jour. Herp. 36: 169-176.
- Vitt, L.J. (1992): Diversity of reproductive strategies among Brazilian lizards and snakes: the significance of lineage and adaptation. In Reproductive Biology of South American Vertebrates, p. 135-149. Hamlett, W.C., Ed., New York, Springer-Verlag.
- Zar, J.H. (1999): Biostatistical analysis. New Jersey, Prentice-Hall International Inc.

Conclusões gerais

- Há variação intraespecífica em relação à maturação sexual em *Crotalus durissus*. Machos e fêmeas do nordeste do Brasil e da América Central atingem a maturidade sexual com tamanhos semelhantes, enquanto na população do estado de São Paulo, no sudeste do Brasil, os machos se tornam sexualmente maduros com comprimento menor que as fêmeas.
- Machos de *Bothrops leucurus* e *Bothrops erythromelas* alcançam a maturidade sexual com comprimento menor que as fêmeas.
- Fêmeas sexualmente maduras de *B. erythromelas* são maiores que os machos. Não há diferença entre o tamanho dos sexos em *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus*, espécies em que já foi relatada a ocorrência de combate entre os machos.
- Os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *B. erythromelas*, *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus* são sazonais.
- Em *C. durissus*, a vitelogênese ocorre em um período bem marcado do ano (do final do outono ao final da primavera), enquanto em *B. erythromelas* e *Bothrops leucurus*, folículos vitelogênicos são encontrados em todas as estações do ano. Porém, isto não significa que estas espécies apresentem ciclo contínuo, uma vez que a taxa de deposição de vitelo nos folículos pode variar entre os indivíduos de uma população e ser influenciada por vários fatores como variação das taxas hormonais, condição corpórea da fêmea e disponibilidade de alimento no ambiente. Além disso, o nascimento dos filhotes ocorre sempre na mesma época do ano, o que comprova que os ciclos são sazonais.
- O ciclo reprodutivo das fêmeas de *C. durissus* da região nordeste do Brasil é idêntico ao ciclo previamente descrito para a população do estado de São Paulo, na região sudeste. Desta forma, pode-se dizer que as relações filogenéticas exercem um papel determinante sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas desta espécie.

- Exceto pelo período de vitelogênese estendido, o ciclo reprodutivo das fêmeas de *B. erythromelas* é semelhante ao padrão previamente proposto para o gênero *Bothrops*, o que reforça a hipótese da influência das relações de parentesco sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas neste gênero.
- Nas espécies do grupo *Bothrops atrox*, que inclui *B. leucurus*, *B. moojeni*, *B. atrox* e *B. asper*, ocorre variação na época de ocorrência de um ou mais eventos reprodutivos, como vitelogênese, ovulação, nascimento dos filhotes e possivelmente acasalamento, em relação ao padrão proposto para o gênero.
- A estocagem de espermatozóides no útero das fêmeas por meio da contração muscular uterina durante o inverno em *Crotalus durissus* e *Bothrops leucurus* é um evento obrigatório, uma vez que a cópula e a ovulação não ocorrem sincronicamente.
- A estocagem de esperma nas fêmeas de *B. erythromelas* não foi confirmada neste estudo, pois fêmeas apresentando contração muscular uterina não foram identificadas em nossa amostra. Porém, como a cópula e a ovulação também são eventos dissociados nesta espécie, é esperado que ocorra estocagem de esperma no trato reprodutivo das fêmeas.
- O nascimento dos filhotes das três espécies estudadas é concentrado no verão e pode ocorrer também no início do outono em *C. durissus* e *B. leucurus*.
- As três espécies estudadas apresentam ciclo espermatogênico sazonal. Em *C. durissus* e *B. leucurus*, a produção de espermatozóides ocorre durante a estação de acasalamento, no outono. O ciclo reprodutivo destas espécies pode ser classificado como associado, pré-nupcial ou tipo I.
- Em *B. erythromelas*, a produção de espermatozóides ocorre durante o verão, época em que anfíbios anuros e centípedes, que são presas desta espécie de serpente, são mais abundantes. Como a cópula só ocorre no outono, época em que o testículo está em fase de repouso, o ciclo reprodutivo desta espécie pode ser classificado como dissociado, pós-nupcial ou tipo III.

- O epitélio do ducto deferente de *B. leucurus* apresenta modificações estruturais associadas à estocagem de esperma durante o verão e o outono (época de acasalamento), estações em que os espermatozóides estão sendo produzidos nos testículos.
- *Bothrops erythromelas* apresenta variação intrapopulacional em relação aos padrões de estocagem de esperma no ducto deferente. O epitélio do ducto deferente pode apresentar modificações associadas à estocagem de esperma do verão (época em que os espermatozóides são produzidos) até o outono (época da cópula), ou somente durante o outono. Esta última estratégia pode incluir a estocagem dos espermatozóides no epidídimo durante o verão.
- As análises histológicas foram fundamentais para a compreensão das estratégias reprodutivas empregadas pelas espécies em estudo, especialmente em relação ao ciclo reprodutivo dos machos. Ao analisar somente a variação do volume dos testículos e diâmetro do ducto deferente, os mesmos dados poderiam ter conduzido a conclusões falsas e opostas àquelas que foram aqui apresentadas.
- Um padrão conservado ao longo das linhagens filogenéticas foi observado em relação aos eventos dos ciclos reprodutivos das fêmeas, embora as espécies do grupo *Bothrops atrox* apresentem variação temporal em relação ao padrão proposto na literatura, possivelmente por influência das condições climáticas.
- O ciclo reprodutivo dos machos parece sofrer maior influência das condições climáticas investigadas (precipitação e temperatura) em comparação com o ciclo reprodutivo das fêmeas, que é fortemente influenciado pelo componente filogenético.

Apêndice – Identificação dos exemplares utilizados

Crotalus durissus

Instituto Butantan – 51218, 50688, 50352, 50694, 28856, 50353, 34313, 22021, 53353, 51792, 51672, 51793, 50221, 51131, 52975, 50222, 51778, 50508, 50404, 50504, 52040, 51210, 50330, 50993, 40853, 50402, 51216, 50513, 1634, 1616, 1388, 50354, 42732, 52041, 50778, 40121, 50115, 51518, 49123, 32377, 52388, 42692, 23770, 52305, 43668, 23400, 51205, 58296, 54627, 52885, 31179, 50938, 51214, 52395, 51208, 53159, 50517, 29177, 55114, 32303, 52976, 54837, 53173, 53336, 51207, 34364, 47733, 50889, 50319, 51128, 52870, 52868, 52776, 73654, 21139, 53439, 50323, 16073, 16068, 31762, 47122, 1633, 33730, 50351, 51215, 52769, 50502, 54560, 53113, 50318, 51514, 51224, 50328, 50966, 52396, 52394, 51221, 51225, 44532, 40104, 40020, 54650, 54525, 53335, 53354, 17201, 51419, 51776, 51940, 51209, 51212, 51213, 51222, 50494, 30334, 52887, 52888, 52387, 52389, 23986, 51673, 50903, 48308, 50339, 50977, 43603, 41043, 32327, 52770, 51780, 51763, 55080, 54871, 51635, 51513, 52816, 50963, 52777, 16944, 16908, 50094, 50965, 50109, 55271, 55270, 52277, 34001, 5584, 5225, 50579, 56899, 50338, 2228, 2656, 32384, 50111, 53425, 51516, 54505, 50114, 32337, 34103, 51226, 51219, 49122, 26194.

MZUESC – Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz – 6053, 705, 1960, 539, 3785, 3489.

CZGB – Coleção Zoológica Gregório Bondar – 9526, 8508, 9284, 6340, 7317, 5312, 5089, 6054, 5311, 6472, 1517, 3909, 6341, 7316, 6768, 7469, 1255, 3319, 8796, 9527, 9283, 9182, 8207, 9282, 2551.

Bothrops leucurus

Instituto Butantan – 51470, 34112, 44626, 45515, 45469, 45062, 31079, 40904, 31046, 56330, 54630, 56552, 30714, 46213, 33220, 28690, 53600, 28679, 28695, 30565, 30471, 30421, 53231, 23643, 23763, 22857, 22861, 23238, 22966, 23059, 23766, 22859, 23436, 22967, 23672, 23031, 22968, 23239, 22944, 22884, 23687, 23762, 23645, 23765, 53234, 24361, 24358, 23962, 24291, 24200, 53232, 55549, 55550, 55566, 24354, 26790, 24146, 24357, 32225, 55647, 30448, 30535, 27180, 26861, 24103, 25091, 23858, 23955, 23859, 51027, 49676, 49619, 160, 164, 93, 191, 167, 50802, 50765, 50086, 45921, 44218, 51930, 51247, 54544, 54520, 54521, 54409, 54715, 50935, 50936, 50929, 50916, 50920, 50923, 54280, 54331, 54277, 54286, 54412, 54495, 54292, 54329, 54288, 54284, 54279, 51028, 51022, 77435, 77434, 53407, 51511, 50956, 51509, 51240, 51245, 55362, 51545, 29797, 44631, 45517, 45520, 45503, 47615, 44008, 28903, 56328, 40332, 28694, 28944, 31327, 30439, 31280, 30412, 30467, 30668, 53233, 155, 183, 143, 189, 185, 50924, 50921, 50919, 184, 190, 50821, 50820, 50399, 50126, 50084, 50805, 50804, 50087, 51502, 53541, 51506, 54294, 54319, 54285, 54317, 54293, 54716, 54567, 54314, 49617, 49618, 49677, 51029, 51030, 49620, 51021, 50918, 51508, 50754, 45969, 54558, 54526, 44216, 54289, 54418, 54281, 54283, 50926, 50932, 50915, 50928, 50922, 149, 159, 151, 154, 148, 55085, 44591, 32278, 24365, 29747, 30511, 51865, 30428, 55469, 56886, 56885, 55519, 56884, 55563, 146, 54878, 54257, 54919, 50773, 50925, 54282, 54320, 54287, 54316, 51331, 51332, 51238, 51248, 51500, 53540, 46733, 51639, 56554, 50092, 50917, 55567, 55562, 24367, 27184, 27179, 24273, 24370, 56813, 171, 50930, 50913, 54301, 51501.

MZUESC – Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz – 7575, 5096, 5701, 5673, 5771, 5633, 5658, 5775, 5766, 5702, 5774, 5926, 3490, 3780, 5779, 1791, 6234, 1812, 1804, 5762, 5763, 5765, 6542, 6437, 5944, 5708, 5764, 5723, 6259.

CZGB – Coleção Zoológica Gregório Bondar – 5806, 5602, 5214, 112, 1472, 1172, 3621, 1754, 1760, 4106, 4118, 3153, 3058, 3012, 1869, 818, 882, 260, 4249, 3514, 624, 541, 1453, 532, 1452, 1130, 5169, 5346, 5344, 3592, 1729, 1716, 4116, 4105, 2182, 3599, 1749, 3622.

Bothrops erythromelas

Instituto Butantan – 53614, 53879, 29263, 53900, 55540, 55542, 43125, 33807, 32409, 40118, 41372, 28833, 33808, 53915, 2812, 40004, 2802, 31614, 27444, 26782, 40868, 2817, 33620, 33881, 40025, 2808, 2803, 2822, 2821, 2815, 2816, 2811, 33521, 2806, 2804, 2809, 55069, 51554, 54503, 42890, 55096, 49634, 50173, 50631, 51938, 50731, 46087, 41103, 51687, 50901, 50869, 50946, 51686, 50481, 50510, 51004, 50892, 50846, 50907, 50948, 56553, 50678, 51530, 50947, 51523, 50397, 50530, 51527, 51526, 51017, 52381, 52035, 52797, 53880, 52312, 52798, 50335, 52375, 45078, 53776, 44405, 46097, 51316, 53215, 43878, 53337, 51691, 45690, 50526, 51122, 53360, 46748, 52157, 52156, 49860, 51123, 51327, 77517, 50616, 46068, 51692, 52829, 50172, 48936, 52361, 51531, 51689, 49804, 40037, 26960, 10134, 40096, 33153, 2813, 40922, 50964, 53016, 51413, 50690, 26167, 49633, 45796, 33799, 26402, 26801, 2820, 50685, 50030, 51532, 51762, 52853, 51627, 51937, 51688, 2807, 33809, 33733, 33736, 33810, 52034, 50673, 45876, 45880, 51138, 41155, 40340, 50629, 33028, 50151, 50149, 50158, 50154, 40909, 50152, 50153, 50157, 50156, 50150, 50155, 53888, 55017, 33011, 53833, 53887, 52778, 9044, 37522, 50506, , 40928, 27606, 27119, 40212, 44635, 40032, 31530, 33735, 32488, 33734, 26513, 26474, 33737, 33731, 26893, 45693, 42926, 31790, 2814, 3084, 26676, 51253, 55541, 33732, 16163, 51624, 40315, 26473, 49475, 27287, 45805, 10133, 53321, 50942, 52400, 51537, 45726, 50527, 50334, 52023, 52796, 51521, 50847, 51690, 50626, 9635, 51070, 50627, 50519, 50537, 50680, 51693, 51553, 48971, 50507, 52850, 53195, 50908, 50581, 50939, 51936, 50941, 50950, 51524, 50598, 51528, 50949, 51529, 51694, 52397, 51525, 51935, 52037, 50972, 50333, 49527, 45999, 50529, 51415, 43947, 42958, 51430, 53914, 50331, 50583, 53241, 59391, 48638, 74485, 50940, 34340, 40364, 32478, 40110, 41143, 50909, 49474, 51522.