



Renata Perez Maciel

Revisão taxonômica e sistemática filogenética do complexo de espécies associadas à *Amphisbaena darwini* (Amphisbaenia: Amphisbaenidae) a partir de dados morfológicos e moleculares

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2016**



Renata Perez Maciel

Revisão taxonômica e sistemática filogenética do complexo de espécies associadas à *Amphisbaena darwini* (Amphisbaenia: Amphisbaenidae) a partir de dados morfológicos e moleculares

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal

Área de Concentração: Biologia Comparada
Linha de Pesquisa: Sistemática e Biogeografia
Orientador: Prof. Dr. Márcio Borges-Martins

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2016**

Revisão taxonômica e sistemática filogenética do complexo de espécies associadas à *Amphisbaena darwini* (Squamata: Amphisbaenidae) a partir de dados morfológicos e moleculares

Renata Perez Maciel

Comissão examinadora:

Dr. Luiz Roberto Malabarba

Dr. Nelson J. R. Fagundes

Dr. Roberto Baptista de Oliveira



*Closing time, open all the doors
And let you out into the world
Dan Wilson*

Deixando o Pago

Vitor Ramil

*Alcei a perna no pingo
E saí sem rumo certo
Olhei o pampa deserto
E o céu fincado no chão
Troquei as rédeas de mão
Mudei o pala de braço
E vi a lua no espaço
Clareando todo o rincão*

*E a trotezito no mais
Fui aumentando a distância
Deixar o rancho da infância
Coberto pela neblina
Nunca pensei que minha sina
Fosse andar longe do pago
E trago na boca o amargo
Dum doce beijo de china*

...
*Cruzo a última cancela
Do campo pro corredor
E sinto um perfume de flor
Que brotou na primavera.
À noite, linda que era,
Banhada pelo luar
Tive ganas de chorar
Ao ver meu rancho tapera*

*Como é linda a liberdade
Sobre o lombo do cavalo
E ouvir o canto do galo
Anunciando a madrugada
Dormir na beira da estrada
Num sono largo e sereno
E ver que o mundo é pequeno
E que a vida não vale nada*

...
*Falam muito no destino
Até nem sei se acredito
Eu fui criado solito
Mas sempre bem prevenido
Índio do queixo torcido
Que se amansou na experiência
Eu vou voltar pra querência
Lugar onde fui parido*

Agradecimentos

Nesses últimos 5 anos (e pouco), muito aconteceu, pessoas surgiram, pessoas se foram, pessoas passaram... Tudo isso foi sentido e digerido da forma que foi possível...

O primeiro agradecimento vai a minha família, que ficou ainda menor nesses anos, mas que está sempre presente, sempre acompanhando, sempre sofrendo e se alegrando com qualquer ponto do processo. Valeu mãe, dinda e vó, talvez não aguentasse o processo sem a segurança de casa.

Ao Robson pelo arroz, pelas figuras, pelos muitos ‘já vai passar, ta acabando’ que acompanharam esses últimos tempo. E por ser tão inesperado, tão natural e agora fazer parte de todos os planos.

Agradeço ao Marcio pela orientação, por aturar todos os tipos de chique, e ainda acabar achando todo o resultado super legal e ‘tu tava cansada, agora tu viu isso mais claro agora?’. Valeu chefe.

Agradeço a Leticia por ter me acompanhado nesses últimos anos, me fazendo entender e pensar no que estava acontecendo e processar isso de outra maneira. Isso fez toda a diferença.

Agradeço a esse povo da herpeto, que só aumenta e nem sei quem mais tá por aí. Valeu por muitas vezes concordarem com minhas reclamações e por serem sempre uma voz animada (as vezes demais) no dia-a-dia disso tudo: Mi, Thay, Mila, Maricota, vocês são doidas e isso é sempre é engraçado. Rodri, Lídia, Malu, Raissa, Nathi, Nathizinha, Debs, Ju, Debs loira, Tobias, Cassia, Manu, Carolzinha, Carol, Rê, Valen, Ismael, Dalmolin, Camila vocês também entram na zona de maluquice, com ou sem filtro, mais ou menos convívio, mas sempre na porção divertida do que foi esse negócio todo. Um agradecimento especial a Fabi, Jé e Ana Ju que foram, deixaram muita saudade, mas a gente sempre de ‘vê’ por aí. Dieguito, valeu a parceria! Tutu, tu é um doce, valeu por tudo!

Ao povo do PPG que sofria também com todo esse processo e entendia a pressão, a alegria, a loucura, e o ‘não quero mais, socorro’, que isso tudo significa. A Rê da molecular e demais frequentadores do laboratório que estavam sempre dispostos a discutir e ajudar a entender o que acontecia com aqueles vários tubinhos de líquidos transparentes. Tinha muita coisa lá dentro! hehe

Aos amigos de sempre: Henrique (ainda te devo uma cerveja), Pri e Aline (muitas risadas e sushi), Su e Mi, Bruno, Alessandro, Carine (essa escola tinha q deixar algo bom!). Cá, amiga, só valeu!, sei nem o que dizer... companhia da vida dos últimos anos! <3

Claro que não podem faltar aos agradecimentos oficiais, ao pessoal que emprestou material ou me recebeu em diversas coleções: Gláucia, Moema e Lú, Paulo Passos, Júlio Moura-Leite, Julian Faivovich, Santiago Nenda, Diego Arrieta, Raúl, Diego Baldo. E um agradecimento especial ao Claudio Borteiro, Francisco Kolenc e Diego Barraso que sempre estiveram a postos a ou nos encontrar em campo e ou enviar material, valeu!

A Capes e Cnpq pela bolsa e financiamento do Protax.

Espero não ter esquecido ninguém.

Valeu pessoal!

Sumário

Resumo	9
Introdução Geral	10
Objetivos.....	13
Estrutura da Tese	14
Referências	16
Capítulo I.....	19
Capítulo II.....	38
Resumo.....	40
Introdução	41
Material e Métodos	43
Resultados	46
Considerações taxonômicas	48
Conclusões	48
Referências.....	49
Apêndice I.....	56
Capítulo III.....	59
Resumo.....	61
Introdução	62
Material e Métodos	64
Resultados	68
Referências.....	71
Apêndice 1	76
Apêndice 2	78
Apêndice 3	82
Considerações finais	85

Resumo

Amphisbaenidae é a mais diversa das seis famílias de Amphisbaenia, com 12 gêneros e 176 espécies distribuídas no Caribe, África e América do Sul. Mesmo com uma melhor descrição da diversidade atual do grupo, há uma necessidade clara de revisões taxonômicas e de descrições morfológicas detalhadas que auxiliem nas identificações dos táxons e seus limites. São ainda comuns identificações equivocadas em coleções científicas, em parte pela má delimitação de muitos táxons ao longo de suas distribuições geográficas. Até a década de 1960, não existiam trabalhos de revisão taxonômica que incluíssem anfisbenas Sul-Americanas. Alguns grupos de espécies foram propostos, tendo por base similaridades morfológicas. Apesar de várias espécies já estarem formalmente descritas na época, a maioria dos exemplares da região sul da América do Sul, depositados em coleções científicas, eram identificados como *Amphisbaena darwinii* Duméril & Briçon 1839. Gans (1966) realizou uma extensa revisão e identificou uma complexa diversidade de formas amplamente distribuídas nas regiões sudeste e sul do Brasil, Uruguai e Argentina, reconhecendo um grupo de espécies relacionadas à *Amphisbaena darwinii*. Esse complexo, composto inicialmente por oito espécies (*A. albocingulata*, *A. darwinii*, *A. heterozonata*, *A. hogei*, *A. munoai*, *A. prunicolor* e *A. trachura*), era associado por apresentar similaridades morfológicas e de distribuição geografia. Vários destes táxons apresentam sobreposição em suas características (número de anéis do corpo, cauda e segmentos dorsais e ventrais), o que vinha dificultando a sua identificação. Com o acúmulo de dados oriundos de coletas realizadas na última década e através de revisões prévias, observamos a existência de variações morfológicas não descritas e limites mal definidos entre essas espécies. Essas observações reforçaram a necessidade de uma revisão taxonômica detalhada dos táxons associados à *Amphisbaena darwinii*, além de testar o relacionamento filogenético destes táxons. Revisando as espécies de *Amphisbaena* associadas à *A. munoai* observamos existência de uma diversidade maior que a formalmente descrita, com pelo menos cinco linhagens principais, que apresentam distribuição geográfica disjunta e distâncias genéticas compatíveis com o status de espécies plenas. Das cinco linhagens, apenas duas estão associadas a nomes disponíveis, sendo as outras três descritas no presente estudo. Em relação às espécies mais associadas à *Amphisbaena darwinii*, nossos resultados identificaram a presença de três táxons, um destes novo, e um complexo de espécies com pelo menos duas linhagens uma ao sul do Rio Grande do Sul e outra no Uruguai. Esses resultados aumentam para nove as espécies, deste grupo, conhecidas de *Amphisbaena* para a região sul do Brasil, Uruguai e Argentina. A relação filogenética dos táxons do grupo *darwinii* foi testada utilizamos uma matriz com 4323 caracteres, sendo um total de 4271 pares de bases (quatro genes mitocondriais e quatro genes nucleares) e 51 caracteres de morfologia interna e externa. Nosso resultado corrobora a hipótese de monofilia do grupo, identificando, contudo, poucas sinapomorfias morfológicas. Além disso, reforça que a utilização da nomenclatura genérica atual torna *Amphisbaena* um agrupamento parafilético. Estudos com a inclusão de um maior número de espécies são necessários para a tomada de decisões quanto as considerações taxonômicas ao nível genérico entre as Amphisbaenidae Neotropicais.

Introdução Geral

Amphisbaenia Gray 1844 é um grupo monofilético de répteis Squamata (Lee 1998; Kearney 2003, Kearney & Stuart 2004, Macey et al. 2004, Conrad 2008, Pyron et al 2013, Longrich et al 2015) totalmente adaptados ao modo de vida fossorial (Gans 1974, 1978, Kearney 2003). Possuem diversas características consideradas vantajosas para esse modo de vida como corpo alongado, cauda curta, além de modificações no ouvido interno e um crânio fortemente ossificado e modificações dependendo do modo de escavação que utilizam (Gans 1974, Kearney 2003). Embora a origem do clado permaneça em discussão (Gauthier et al 2012), diversos estudos as relacionam com Lacertidae, indicando que sua similaridades com serpentes e outros Squamata ‘serpenteformes’ pode ser convergente (Vidal & Hedges 2005, Conrad 2008, Gauthier et al 2012, Pyron et al 2013, Longrich et al 2015).

São reconhecidas atualmente seis famílias, sendo Amphisbaenidae Gray 1865 a mais diversa, com 12 gêneros e 176 espécies distribuídas no Caribe, América do Sul e África subsaariana (Gans 2005, Measey & Tolley 2013, Costa & Bérnils 2015, Uetz & Hosek 2016). Todas as hipóteses de relacionamento filogenético disponíveis consideram Amphisbaenidae grupo irmão de Trogonophidae 1865, formando o clado Afrobaenia Gauthier et al 2012 que provavelmente teve sua origem na África (Gauthier et al 2012, Measey & Tolley 2013, Longrich et al 2015). Estudos recentes sugerem a origem de Amphisbaenidae no Paleoceno, através de eventos de dispersão a longas distâncias da América do Norte para a África (64,7–56 milhões de anos atrás), com posterior dispersão para América do Sul (43,4–35,8 milhões de anos atrás) e Caribe (34,7–30 milhões de anos atrás) (Longrich et al 2015). Os Amphisbaenidae atuais, apresentam fortes indicativos de radiação adaptativa e diversidade paralela entre África e América do Sul, apresentando formatos de cabeça similares nos dois continentes, provavelmente devido a evolução convergentes de estratégias especializadas para escavação (Longrich et al 2015).

As hipóteses de relacionamento filogenético dentro de Amphisbaenidae são escassas e instáveis, variando conforme os táxons ou caracteres incluídos (Mott & Vieites 2009; Measey & Tolley 2013; Longrich et al 2015). Nas hipóteses moleculares, as espécies Africanas não formam um agrupamento monofilético, porém o clado com os gêneros *Geocalamus* Günther 1880, *Dalophia* Gray 1865 e *Monopeltis* Smith 1848 é recuperado como grupo irmão das espécies Neotropicais (Measey & Tolley 2013, Longrich et al 2015). As espécies Caribenhas são recuperadas em um clado monofilético entre os demais clados de Amphisbaenidae sul-americanas (Mott & Vieites 2009; Longrich et al 2015), o que, segundo Longrich et al

(2015), indica uma dispersão secundária de Amphisbaenidae sul-americanas para a América Central.

Em relação a morfologia, as sinapomorfias são disponíveis apenas para o reconhecimento entre as famílias (Kearney 2003, Conrad 2008, Gauthier et al 2012), sendo o reconhecimento de gêneros e demais agrupamentos infra-genéricos dependentes de características morfológicas externas, sem teste de significância filogenética. Nas espécies Sul-americanas, os gêneros tradicionalmente reconhecidos e diagnosticáveis principalmente pelas modificações no formato da cabeça e cauda (*Anops* Bell 1833, *Aulura* Barbour 1914, *Bronia* Gray 1865, *Cercolophia* Vanzolini 1992 e *Leposternon* Wagler 1824), não se mostraram monofiléticos, o que levou à proposta de sinonimização de todos a *Amphisbaena* (Mott & Vieites 2009). Ribeiro et al (2012) argumentarem contra a proposta de Mott & Vieites (2009) para manter *Leposternon*, sendo este o único gênero monofilético obtido através das análises (ver Mott & Vieites 2009, Pyron et al 2013, Longrich et al 2015). Esse arranjo tornou *Amphisbaena* parafilético, mas é utilizado para evitar novas mudanças taxonômicas neste grupo que apresenta relacionamento filogenético ainda instável (Costa & Bérnils 2015). Portanto, a delimitação de muitos grupos é tentativa e tem como base associações taxonômicas tradicionais entre as espécies morfológicamente mais similares (ver Vanzolini 1951; Gans 1962, 1966, 1971). Caracteres merísticos ou de escutelação cefálica, amplamente empregados no reconhecimento de grupos, têm significância filogenética incerta.

O Brasil possui a maior diversidade de espécies de Amphisbaenidae da América do Sul, com três gêneros e 73 espécies reconhecidas (Costa & Bérnils 2015, Uetz & Hosek 2016), algumas delas, descritas nos últimos anos, baseadas principalmente em novas coletas (ver Pinna et al 2010; Gomes & Maciel 2012; Pinna et al 2014; Roberto et al 2014; Teixeira et al 2014). Mesmo com uma melhor descrição da diversidade atual do grupo no país, ainda são escassos os estudos com caracterizações morfológicas e que auxiliem nas identificações dos táxons e seus limites (Vanzolini 2002, Ribeiro et al 2009, Perez et al 2012; Pinna et al 2010), sendo ainda comum as identificações equivocadas dos exemplares nas coleções científicas e a má delimitação dos táxons ao longo de suas distribuições geográficas.

Ao revisar as espécies de *Amphisbaena* do sul da América do Sul, Gans (1966) reconheceu um complexo de espécies comumente associadas à *Amphisbaena darwinii* Duméril & Bibron 1839. Essas espécies, *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885, *A. heterozonata* Burmeister 1861, *A. hogei* Vanzolini 1950, *A. munoai* Klappenbach 1960, *A. nigricauda* Gans 1966, *A. prunicolor* (Cope 1885) e *A. trachura* Cope 1885, em algum momento foram identificadas ou descritas a partir de *A. darwinii*. A associação inicial entre

essas espécies, no entanto, não é clara, os exemplares compartilham algumas características como cerca de 200 anéis do corpo, menos de 40 segmentos no anel do meio do corpo e quatro poros pré-cloacais que são observadas em outras espécies de *Amphisbaena*. Além disso, Gans (1966) reconheceu *A. heterozonata* e *A. trachura*, como subespécies de *A. darwinii*; *A. albocingulata* como subespécie de *A. prunicolor*; invalidou a determinação feita por Vanzolini (1950) identificando *A. hogei* como uma espécie plena e não como uma subespécie de *A. darwinii*; descreveu *A. nigricauda*; e fez comentários sobre a variação de *A. munoai*. Anos mais tarde, Vanzolini (2002) elevou ao nível específico essas táxons indicados como subespécies, sem comentários acerca de das diagnoses. A identificação destas espécies permaneceu baseada nos caracteres subespecíficos indicados em Gans (1966) tornando-se complexa devido à grande sobreposição de caracteres morfológicos. No entanto, *Amphisbaena darwinii* e *A. munoai* têm sido hipotetizadas como espécies irmãs em todas hipóteses filogenéticas disponíveis (ver Mott & Vieites 2009, Measey & Tolley 2013, Longrich et al 2015).

Considerando o acúmulo de dados oriundos de coletas realizadas na última década e revisões prévias (ver Perez et al 2012) observamos a existência de variações morfológicas não descritas e limites mal definidos entre esses táxons. Essas observações reforçaram a necessidade de uma revisão taxonômica detalhada dos táxons associados à *Amphisbaena darwinii*, além de apresentar uma hipótese de relacionamento filogenético testando se formam um agrupamento monofilético e discutindo sua relação com demais *Amphisbaena*.

O presente projeto foi vinculado ao projeto ‘Taxonomia e Sistemática de Lagartos e Serpentes (Lepidosauria, Squamata) no Bioma Pampa no sul do Brasil e Uruguai’, aprovado pelo Edital MCT/CNPq/MEC/CAPES nº 52/2010 do Programa de Capacitação em Taxonomia (PROTAX).

Objetivos

- I. Revisar e (re)descrever as unidades taxonômicas associadas à *Amphisbaena munoai* no sul do Brasil e Uruguai.
- II. Revisar e (re)descrever as unidades taxonômicas associadas à *Amphisbaena darwini* no sul do Brasil, Uruguai e Argentina.
- III. Apresentar uma hipótese de relacionamento filogenético para as espécies associadas à *Amphisbaena darwini*, testando se formam um grupo monofilético e discutindo sua relação com os demais grupos de *Amphisbaena*.

Estrutura da Tese

A tese está organizada em três capítulos que seguem a formatação das revistas a que serão submetidos, menos em relação a disposição das figuras, incluídas no meio do texto para facilitar a interpretação.

- **Capítulo I** – Revisão taxonômica das pequenas anfisbenas relacionadas à *Amphisbaena munoai* Klappenbach 1960 do extremo sul do Brasil e Uruguai (Amphisbaenia, Amphisbaenidae)
 - Neste capítulo avaliamos a existência de unidades taxonômicas entre espécimes recentemente coletadas e morfologicamente similares à *Amphisbaena munoai* e *A. prunicolor*. Nossos resultados indicaram uma diversidade maior que a conhecida com pelo menos cinco linhagens principais, distribuídas de forma disjunta na região sul do Brasil e Uruguai. Essas linhagens apresentam forte estrutura filogenética e divergências morfológicas compatíveis com espécies plenas.

- **Capítulo II** – Revisão taxonômica das cobras-cegas associadas à *Amphisbaena darwinii* Duméril & Bibron 1839 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae).
 - Neste capítulo utilizamos caracteres morfológicos (qualitativos e quantitativos), análises filogenéticas moleculares (genes mitocondriais e nuclear) e limites geográficos para reavaliação o status taxonômico das espécies associadas à *Amphisbaena darwinii*. Nossos resultados indicam a existência de um novo táxon, confundido com *A. trachura* e *A. darwinii*, e dificultado a delimitação destas espécies. Além disso, restringe o complexo *Amphisbaena darwinii* a duas linhagens, uma com população no sul do Rio Grande do Sul, Brasil e outra com população em Montevideo. E redefine a variação de *Amphisbaena trachura* e *A. heterozonata*.

- **Capítulo III** – Sistemática filogenética do grupo de *Amphisbaena darwinii* Duméril & Bibron 1839 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae), baseado em caracteres morfológicos e moleculares.
 - Neste capítulo a monofilia do grupo *darwinii* é investigada através de caracteres morfológicos e moleculares. A matriz com 39 táxons e 4323 caracteres (4227 moleculares e 51 morfológicos) foi analisada através de Inferência Bayesiana. Os

resultados sugerem que o grupo *darwinii* é monofilético e é fortemente relacionado à *Amphisbaena kingii*, seu grupo irmão.

Referências

- Barbour, T. (1914). Some new reptiles. *Proceedings of the New England Zoölogy Club* 4: 95–98.
- Bell, T. (1833). Characters of two new genera of reptiles. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1833(1): 97–101.
- Boettger, O. (1885). Liste von Reptilien und Batrachiern aus Paraguay. *Zeitschrift der Naturwissenschaft*, ser. 4, v. 58, n. 3, p. 213–248.
- Burmeister, C.H.C. (1861) *Reise durch die La Plata-Staaten mit besonderer Rücksicht auf die physische Beschaffenheit und den Culturzustand der Argentinischen Republik. Ausgeführt in den Jahren 1857, 1858, 1859 und 1860.* Halle: H.W. Schmidt, 2 vols. [1: vi1502; 2: vi1538 pp.]
- Conrad, J.L. (2008) Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 310, 1–182.
- Cope, E. D. (1885). Twelfth contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the American Philosophical Society*, v. 22, n. 118, p. 167– 194.
- Costa, H. C.; Bérnils, R. S. (2015). Répteis brasileiros: lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 4, p. 75-93.
- Duméril, A.M.C., & Bibron, G. (1839) *Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des reptiles.* Errata. De l'ordre des Lézards ou des Sauriens. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris, 5, I + VIII + 1–856pp.
- Gans, C. (1962). Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 3. Redefinition and description of the Brazilian reptiles *Amphisbaena silvestrii* Boulenger and *A. neglecta* Dunn and Piatt. *Copeia* 1962(1): 164–170.
- Gans, C. (1966) Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia) 3. The small species from southern South America commonly identified as *Amphisbaena darwini*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 134, 3, 185– 260.
- Gans, C. (1971). Redescription of three monotypic genera of amphisbaenians from South America: *Aulura* Barbour, *Bronia* Gray and *Mesobaena* Mertens. *American Museum Novitates* 2475: 1–32.
- Gans, C. (1974). *Biomechanics: An Approach to Vertebrate Biology.* J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pennsylvania. 261 pp.
- Gans, C. (1978) The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. *Transactions of the Zoological Society of London*, n. 34, p. 347–416
- Gans, C. (2005) Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 289, 1–130
- Gauthier, J.A, Kearney, M., Maisano, J. A., Rieppel, Ol, Behlke, A. D.B. (2012) Assembling the Squamate Tree of Life: Perspectives from the Phenotype and the Fossil Record. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 53(1):3-308. 2012
- Gray, J. E. (1844). *Catalogue of the tortoises, crocodiles, and amphisbaenians in the collection of the British Museum.* London, British Museum.

Gray, J. E. (1865). A revision of the genera and species of amphisbaenians with the descriptions of some new species now in the collection of the British Museum Proceedings of the Zoological Society of London 1865:442–455.

Gomes, J.; Maciel, A. O. (2012). A new species of *Amphisbaena* Linnaeus (Squamata, Amphisbaenidae) from the state of Maranhão, northern Brazilian Cerrado. *Zootaxa* 3572: 43–54.

Günther, C.A.L.G. (1880). Description of new species of reptiles from eastern Africa. *Annals and Magazine of Natural History*, ser. 5, 6(33): 234–238.

Kearney, M. (2003) Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent fossil forms. *Herpetological Monographs*, n. 17, p. 1-74.

Kearney, M. & Stuart, B. L. (2004). Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *The Royal Society*, n. 271, p. 1677-1683.

Klappenbach, M.A. (1960) Notas herpetológicas. I. *Amphisbaena munõai* n. sp. (Amphisbaenidae). *Comunicaciones en Zoologie do Museo Historia Naturel Montevideo*, 4, 1–12.

Lee, M. S. Y. (1998). Convergent evolution and character correlation in burrowing reptiles: towards a resolution of squamate relationships. *Biological Journal of the Linnaean Society*, n. 65, p. 369-453.

Longrich, N.R., Vinther, J., Pyron, R.A., Pisani, D., and J.A. Gauthier. (2015). Biogeography of worm lizards (Amphisbaenia) driven by end-Cretaceous mass extinction. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 282: 20143034.

Macey, J. R.; Papenfuss, T. J.; Kuehla, J. V.; Fourcadea, H. M.; Boorea, J. L. (2004). Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, n. 33, p. 22-31.

Measey, G. J. (2006). Surveying biodiversity of soil herpetofauna: towards a standard quantitative methodology. *European Journal of Soil Biology*, 42, S103– 10.

Measey, G. J.; Tolley, K. A. (2013) A molecular phylogeny for sub-Saharan amphisbaenians, *African Journal of Herpetology*, 62:2, 100-108.

Mott, T. & Vieites, D. R. (2009). Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 51, p. 190-200.

Pinna, P. H.; Mendonça, A. F.; Bocchiglieri, A.; Fernandes, D. S. (2010). A new two-pored *Amphisbaena* Linnaeus from the endangered Brazilian Cerrado biome (Squamata: Amphisbaenidae). *Zootaxa*, 2569, 44-54.

Pinna, P. H.; Mendonça, A. F.; Bocchiglieri, A.; Fernandes, D. S. (2014). A New Species of *Amphisbaena* Linnaeus, 1758 from a Cerrado Region in Bahia, Northeastern Brazil (Squamata: Amphisbaenidae). *Herpetologica*, 70, 339-349.

Perez, R.; Ribeiro, S.; Borges-Martins, M. (2012). Reappraisal of the taxonomic status of *Amphisbaena prunicolor* (Cope 1885) and *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). *Zootaxa* 3550:1-25.

Pyron, R.A., Burbrink, F.T., and J.J. Wiens. (2013). A phylogeny and updated classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13: 93.

Ribeiro, S; Castro-Mello, C.; Nogueira, C. (2009). New Species of *Anops* Bell, 1833 (Squamata, Amphisbaenia) from Jalapão Region in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 43 (1):21-28.

Roberto, I. J.; Brito, L. B. M.; Ávila, R. W. (2014). A new six-pored *Amphisbaena* (Squamata: Amphisbaenidae) from the coastal zone of northeast Brazil. *Zootaxa* 3753 (2): 167–176.

Smith, A. (1848). *Illustrations of the zoology of South Africa*. London: 1838–1849.

Teixeira, M.; Dal Vechio, F.; Mollo Neto, A.; Rodrigues, M. T. (2014). A New Two-Pored *Amphisbaena* Linnaeus, 1758, from Western Amazonia, Brazil (Amphisbaenia: Reptilia). *South American Journal of Herpetology* 9 (1): 62-74.

Uetz, P. & Jirí Hošek (eds.) (2016). *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org>, accessed April 17, 2016.

Vanzolini, P.E. (1950) Contribuições ao conhecimento dos lagartos brasileiros da família Amphisbaenidae Gray, 1825. I. Sobre uma nova subespécies insular de *Amphisbaena darwini* D. and B., 1839. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 9, 69–77.

Vanzolini, P.E. (1951). A systematic arrangement of the family Amphisbaenidae (Sauria). *Herpetologica* 7(3): 113–123.

Vanzolini, P.E. (1992). *Cercolophia*, a new genus for the species of *Amphisbaena* with a terminal vertical keel on the tail. *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo 37(27): 401–412.

Vanzolini, P.E. (2002) An aid to the identification of the South American species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). *Papéis Avulsos de Zoologia do MZUSP*, 42, 15, 351–362.

Vidal, N. & Hedges, S. B. (2005). The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C. R. Biologies*, v. 328, p. 1000-1008.

Wagler, J. (1824). *Serpentum Brasiliensium Species Novae ou Histoire Naturelle des Espèces Nouvelles de Serpens*. Munich (Monachii): Franc. Seraph. Hiibschmann, p.72.

Capítulo I

Revisão taxonômica das pequenas anfisbenas relacionadas à *Amphisbaena munoai* Klappenbach 1960 do extremo sul do Brasil e Uruguai (Amphisbaenia, Amphisbaenidae)

(Manuscrito aceito pela *Zoologischer Anzeiger*)

Perez & Borges-Martins (2019). Integrative taxonomy of small worm lizards from Southern South America, with description of three new species (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). *Zoologischer Anzeiger*, Volume 283, November 2019, Pages 124-141.



Contents lists available at ScienceDirect

Zoologischer Anzeiger

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcz

Review

Integrative taxonomy of small worm lizards from Southern South America, with description of three new species (Amphisbaenia: Amphisbaenidae)

Renata Perez^{*}, Márcio Borges-Martins

Programa de Pós-graduação em Biologia Animal e Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, prédio 43435, sala 102, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2019

Received in revised form

24 September 2019

Accepted 24 September 2019

Available online 10 October 2019

Corresponding Editor: Alexander Kupfer

Keywords:

Amphisbaenia

Molecular

Morphology

Reptilia

Squamata

ABSTRACT

Fossorial vertebrates such as amphisbaenians suffer from morphological constraints as a result of their burrowing strategies. The morphology is conserved in many groups and taxonomic arrangements may be confusing within closely related species. *Amphisbaena munoai* and *A. prunicolor* slender bodied worm lizards associated with the *Amphisbaena darwini* species group and distributed in southern South America (southern Brazil and Uruguay) were traditionally considered allopatric and distinguished from each other mainly by their coloration pattern and cephalic shields. However, the reassessment of morphological variation including specimens from new localities indicated the need for a taxonomic reappraisal. We used morphological, molecular and distributional data in an integrative approach to reassess taxonomic diversity and propose a phylogenetic hypothesis for the evolution of the group. Our results indicated a hidden diversity, allowing the description of three new species from Coastal and Grasslands formations in southern Brazil. *Amphisbaena tiaraju* sp. nov. occurs in the northwestern region of Rio Grande do Sul State; *Amphisbaena arenicola* sp. nov. is restricted to Restinga formations in the coastal plain of Santa Catarina State and *Amphisbaena nana* sp. nov. is restricted to the northern portion of the Sul-rio-grandense Shield in Rio Grande do Sul State.

© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

In fossorial vertebrates, the environment imposes strong restrictions on morphology, causing the evolution of convergent and conservative morphology in several groups, including amphisbaenian squamates (e.g., Kearney & Stuart 2004; Measey 2006; Measey & Tolley 2013). In amphisbaenians, the limblessness, body elongation and cranial modifications, are characters related to different burrowing strategies (Kearney 2003; Gans 1974, 1978; Longrich et al. 2015). Morphology is allegedly conserved among several species groups (Gans 1977) and taxonomic arrangements are traditionally based on morphological characters with uncertain phylogenetic significance and lack of intra or interspecific variation, resulting in a confusing taxonomy (Kearney 2003; Gans 2005). Consequently any hypothesis of phylogenetic relationships within amphisbaenians remains scarce and unstable (see Mott & Vieites

2009; Measey & Tolley 2013; Longrich et al. 2015). *Amphisbaena Linnaeus 1758* is the most speciose genus in the family Amphisbaenidae Gray 1865, including a paraphyletic arrangement of 97 species distributed in the Caribbean and South America (Costa & Bérnils 2018; Uetz & Hosek 2018). The diversity, correct identification of species and their boundaries remains an open matter in many groups of *Amphisbaena* (e.g., Vanzolini, 1951; Gans, 1962, 1963a; Gans & Diefenbach, 1972; Vanzolini, 1997, 2002). For a lineage to acquire distinct properties, such as become morphological diagnosable, reciprocally monophyletic, ecological distinct or reproductive incompatible depends on various factors and occur in a different timeframe (Templeton 1981; De Queiroz 1998, 2005, 2007).

This forms a large gray zone within species present only some of these properties and represents a conflict for species delimitation (De Queiroz 1998, 2005, 2007). Recently DNA markers has been used to recognize divergent lineages, hidden in a single species with widespread geographical distribution (Fouquet et al., 2007; Geurgas & Rodrigues 2010; Recoder et al. 2014; Guarnizo et al. 2016). When applying an integrative taxonomical approach it is

^{*} Corresponding author.

E-mail address: renataperez@gmail.com (R. Perez).

also possible to delimit species as a hypothesis (Dayrat 2005; Padial et al. 2010) considering species as a single set of metapopulations evolving separately and forming an ancestor-descendant lineage (De Queiroz 1998, 2005, 2007). Different data sets i.e., geographical distribution, ecological and physiological differences, morphological and molecular data, are relevant evidences for lineages separations and may be used in an integrative way to recognize different species (Padial et al. 2010). Usually, the congruence between more lines of evidence is better to delimit species and their boundaries (Dayrat 2005; De Queiroz 2005; Padial et al. 2010).

When revising South American *Amphisbaena*, Gans (1966) recognized eight species related to *Amphisbaena darwinii* Duméril & Bibron, 1839. These species overlapped in meristic characters (i.e., number of segments and body annulus) and geographical distribution, being sympatric in southern Brazil, eastern Argentina and Uruguay (Gans 1966; Perez et al. 2012). Out of these *Amphisbaena munoai* Klappenbach, 1960 and *Amphisbaena prunicolor* (Cope, 1885) are distinguished from the other congeners by having a slender body, higher number of body annuli (close to 200), the presence of post-malar scales row, a uniform tail coloration and parietal shields enlarged and differentiated from other body shields (Perez et al. 2012). Interspecifically they are conventionally distinguished by the shape of the frontal shields (angular in *A. munoai* and quadrangular in *A. prunicolor*) and their coloration pattern (uniform light brown in *A. munoai* and purplish brown with checkered ventral pattern in *A. prunicolor*) (Perez et al. 2012). In addition they have allopatric distributions i.e., *A. munoai* is found under stones in rocky outcrops in the Uruguayan Savannah in central and southern Rio Grande do Sul state, Brazil and Uruguay and *A. prunicolor* in Atlantic Forest remnants in northern Rio Grande do Sul, western Santa Catarina and Paraná, with historical records in the States of Rio de Janeiro, São Paulo and Espírito Santo, in Brazil; Corrientes and Misiones provinces, in Argentina and Itapúa department, in Paraguay (Perez et al. 2012). During field expeditions into open areas in northwestern Rio Grande do Sul (Missões region in the Araucaria Plateau) and Restingas areas in eastern Santa Catarina (surrounding Santa Catarina Island, Florianópolis municipality) in Southern Brazil specimens morphologically similar to *A. munoai* and *A. prunicolor* were found. Despite the overall similarity, these specimens show pronounced differences in cephalic and body proportions and coloration pattern making a taxonomic allocation impossible. Besides, these specimens were collected in areas where both species were previously unknown to occur. These new findings including the morphological variation previously recorded in *A. munoai* (Perez et al., 2012) reinforced the need for a taxonomic reassessment of amphisbaenids found in southern Brazil and Uruguay.

Herein we applied an integrative taxonomic approach through phylogenetic analysis of molecular markers (mitochondrial and nuclear), jointly with morphology (meristic and morphometric characters), ecology (habitat use), and geographic distribution, which allowed the recognition of a hidden diversity and the need for description of three new species of *Amphisbaena*.

2. Material and methods

2.1. Taxon sampling

Our sample included 293 specimens, all examined for morphological characters. For 67 of these specimens we also obtained DNA sequences for four markers. We included specimens from different localities of the two recognized species, *Amphisbaena munoai* and *A. prunicolor* of southern Brazil and Uruguay, both holotypes were examined and original descriptions revised (i.e. Klappenbach 1960 and Cope 1885) to confirm the identifications.

Besides additional specimens from the new site records, which included at least two disjunct and distinctive populations, one from the surroundings of Florianópolis, State of Santa Catarina, Brazil and the other from the northwest State of Rio Grande do Sul, Brazil. We have sampled specimens to encompass the entire geographic distribution and morphological variation (see Gans 1966; Perez et al. 2012). Specimens were obtained from scientific collections throughout extensive field effort in the region to obtain new records and allow for tissue sampling. The material examined is housed in the following institutions: Academy of Natural Sciences (ANSP), Philadelphia, United States of America; Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Santa Catarina (CHUFSC), Florianópolis, Brazil; Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay (MNHN); Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCN), Porto Alegre, Brazil; Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Porto Alegre, Brazil; Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCL), Curitiba, Brazil; Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Rio de Janeiro, Brazil; Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo, Brazil and Sección de Zoología Vertebrados Facultad de Ciencias UDELAR (ZVCR), Montevideo, Uruguay.

We selected ten species as outgroup for phylogenetic analysis based on the phylogeny of Mott & Vieites (2009), including sequences of *Amphisbaena anaemariae* Vanzolini, 1997, *Amphisbaena angustifrons* Cope, 1861, *Amphisbaena anomala* (Barbour, 1914), *Amphisbaena leeseri* Gans, 1964a, *Amphisbaena silvestrii* Boulenger, 1902 and *Leposternon infraorbitale* (Berthold, 1859) available on Genbank (Accession FJ441668; FJ441689; FJ441694; FJ441707; FJ441712; FJ441723; FJ441911; FJ441932; FJ441937; FJ441950; FJ441955; FJ441966) and sequences of *Leposternon microcephalum* (Wagler, 1824), *A. munoai*, *Amphisbaena darwinii*, *Amphisbaena trachura* Cope, 1885 and *Amphisbaena kingii* (Bell, 1833) generated in the current study. Being aware of the current taxonomic panorama of *Amphisbaena* we also extended our interspecific morphological comparisons to all known taxa, besides the outgroup and the *A. darwinii* complex recognized by Gans (1966) that included *Amphisbaena albocingulata* Boettger, 1885, *Amphisbaena heterozonata* Burmeister, 1861, *Amphisbaena hoguei* Vanzolini, 1950 and *Amphisbaena nigricauda* Gans, 1966 (see also Perez et al., 2012).

2.2. Molecular analyses

DNA was extracted from tissue samples previously preserved in 99% ethanol using the method of Medrano et al., 1990 with modifications. We used primers described previously (see Palumbi 1996; Pook et al. 2000; Macey et al. 2004; Noonan & Chippindale 2006) to obtain partial mitochondrial DNA (mtDNA) sequences from 16S ribosomal (16S), cytochrome b (CYTB) and NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) and partial nuclear sequence from neurotrophin-3 (NT3) genes to infer phylogenetic relationships within the species and to check for concordance between morphological patterns.

Amplifications were performed by polymerase chain reaction (PCR) in a 20 µl volume containing 10–50 ng of DNA, 1X Buffer, 1.5 µM of MgCl₂, 0.2 µM of dNTP, 0.2 µM of each primer, 1U of Taq DNA polymerase and 1 µl Triton 4%. The PCR reactions to 16S and ND2 genes were performed with an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles (94 °C for 45 s, 54 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and 30 s) and a final elongation at 72 °C for 5 min. For CTYB gene an initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles (94 °C for 60 s, 58 °C for 60 s, 72 °C for 2 min) and a final elongation at 72 °C for 5 min. For NT3 an initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles (94 °C for 45 s, 49 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and 30 s) and a final elongation at 72 °C for 5 min.

The software Geneious version 6.1.6 (Kearse et al. 2012) was used to visualize and align sequences as well as a platform to export different formats. The sequences were aligned independently for each gene with Mafft Multiple Alignment plug-in on Geneious (version 1.3, Biomatters Ltd, Katoh, 2013), following the algorithm G–INS–I with standard definitions (gap opening = 1.53, gap extension = 0.123). We performed Bayesian Inference analyses on mitochondrial DNA (1551 bp), nuclear DNA (420 bp NT3 gene) and concatenated data set (1971 bp in total) with MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) to characterize the phylogenetic structure. The analysis was performed with 100 million Markov Chain Monte Carlo (MCMC), sampled every 1000 steps and the first 10% of steps were discarded as burn-in. We implemented the analyses with the GTR + Inv + Gamma model in 16S, SYM + Inv + Gamma in CYTB first partition, GTR + Inv model in CYTB second partition, GTR + Gamma model in CYTB and ND2 third partition, GTR + Gamma model in ND2 first and second partition and HKY + Inv in NT3, based on Partition Finder v1.1.0 previous analysis (Lanfear et al. 2012). We calculated mean distances between groups with software Mega 7 (Kumar et al. 2016), using Tamura–Nei corrected distances (Tamura & Nei 1993), and 1000 bootstrap replicates to estimate standard errors.

2.3. Morphological analyses

The terminology of cephalic shields followed Gans & Alexander (1962) and the arrangement of scales, counts and measures followed Perez et al. (2012). The measurements were taken with a digital caliper of 0.01 mm accuracy, except snout-vent length, measured with a ruler. Sex determination was performed by direct dissection and gonad analysis. To evaluate maturity and sexual dimorphism we followed Shine (1988), Colli & Zamboni (1999) and Balestrin & Cappellari (2011).

For initial comparative analysis, we considered the clades as groups recovered through molecular analysis (see Fig. 1). An exploratory descriptive analysis was performed to summarize the character variation among groups (i.e., means, medians, ranges and standard deviations). Normality and homoscedasticity assumptions were tested using Kolmogorov–Smirnov and Levene, respectively (Zar 2010). ANOVA or Kruskal–Wallis tests were performed to verify significant differences between characters (mean/median) on certain groups. We conducted an exploratory discriminant function analysis in the software Statistica10 (SystatSoftware Inc., 2006) to access the degree of distinction between taxa and possible diagnostic taxonomic characters (Manly 2000; StatSoft Inc., 2011). We used the ratios of morphometric characters and head length or snout-vent length to remove the effect of size in the samples.

3. Results

3.1. Molecular analyses

The phylogenetic analysis recovered a large monophyletic clade with five sub-clades representing distinct taxonomic units. These five monophyletic sub-clades were consistent with the geographic samples from southern Brazil and Uruguay. Based on the distribution and correlation with the holotype (see Perez et al., 2012) the Southern Atlantic Forest (AF) clade corresponded to *Amphisbaena prunicolor* and was identified as the sister group to all other taxa (Fig. 1). The northwestern Rio Grande do Sul, Araucaria Plateau (NW) clade was determined as the sister group to the other three clades. The clade of specimens of the northern portion of the sul-riograndense Shield of Rio Grande do Sul state (NSR) was recognized as sister taxa to the Coastal Plain of Santa Catarina (CP) clade

and the southern region of the sul-riograndense shield in Brazil and Uruguay (SSR) clade. The SSR clade from various localities of southeast Rio Grande do Sul state and northeast Uruguay, including the type locality, corresponded to *A. munoai* specimens. The specimens from the NSR clade corresponded to specimens usually identified as *A. munoai* but considering a morphological variation already noticed by Gans (1966) and reinforced by Perez et al. (2012). The NW and CP clades had no taxonomic allocations.

Corrected mitochondrial DNA distances (genes concatenated) varied between 3.3% and 8.5% within ingroup clades and between 8.6% and 58.3% with the outgroup (Table 1). Most distant *A. prunicolor* specimens varied between 6.7% and 8.5% within the ingroup. The NW and CP clades were the least distant with a variation of only 3.3%. In relation to *A. darwinii* and *A. trachura*, the phylogenetically closest species, the ingroup clades varied between 8.6% and 14.4%. A greater distance observed in *Leposternon microcephalum* and *L. infraorbilata* represented a monophyletic and separate clade in Mott & Vieites 2009 previous analysis.

Considering only the 16S gene (missing data excluded) the corrected distance ranged from 2.4% to 6.9% between the ingroup clades (Table 1) and from 4.1% to 19.9% with the outgroup. The NW clade showed higher distances, varying between 5.1% and 6.9% within the ingroup. *A. munoai*, CP and NSR clades had smaller distances, varying between each other from 2.4% to 3.6%. The distance of the *A. darwinii* complex varied between 4.1% and 7.9%. Greater distances observed in ingroup clades and between *A. anaemariae* and *A. silvestrii*, varying between 18.2% to 19.8% and 18.1%–20.7% respectively.

3.2. Morphological analyses

All meristic characters, except the autotomic annuli, varied significantly (Kruskal–Wallis, $P < 0.01$) between molecular clades (reassembled sample). The exploratory discriminant analysis indicated a greater differentiation between *Amphisbaena prunicolor* than in other groups. The first discriminant function represented 89% of variation and was positively correlated with the number of body annuli (Fig. 2).

Regarding morphometric characters, we observed significant variations between means/medians in almost all characters (Kruskal–Wallis or ANOVA, $P < 0.01$). The first discriminant function represented 71% of variation and was positively correlated to pre-frontal width and negatively correlated to jaw length (Fig. 3A–C) indicating differentiation between *A. prunicolor* and the NSR specimens. The second discriminant function represented only 14.9% of variation and was positively correlated to snout length and negatively to mental width (Fig. 3A, D–E). The discriminant function indicated differentiation between NW and CP specimens.

In our attempt to detect morphological characters in order to differentiate the closest molecular clades (NSR, CP and *A. munoai*), we performed an exploratory discriminant function analysis only with these samples. In our analysis, the first discriminant function represented 57.2% of variation and was positively correlated to nasal suture length and negatively to pre-frontal length, allowing the distinction of CP specimens from the *A. munoai* sample (Fig. 3F–H). The second discriminant function represented 42.8% of variation and was positively correlated to parietal length and negatively to rostral width separating the CP from the NSR sample (Fig. 3F, I–J). The *A. munoai* and SR sample overlapped but had a good tendency to discriminate in both discriminant functions.

The classification matrix for the NW and CP sample of *A. prunicolor* indicated an accuracy of identification of more than 90%. *A. munoai* and the NSR sample had lower values of 86.9% and 83.3% of correspondence respectively (Table 2).

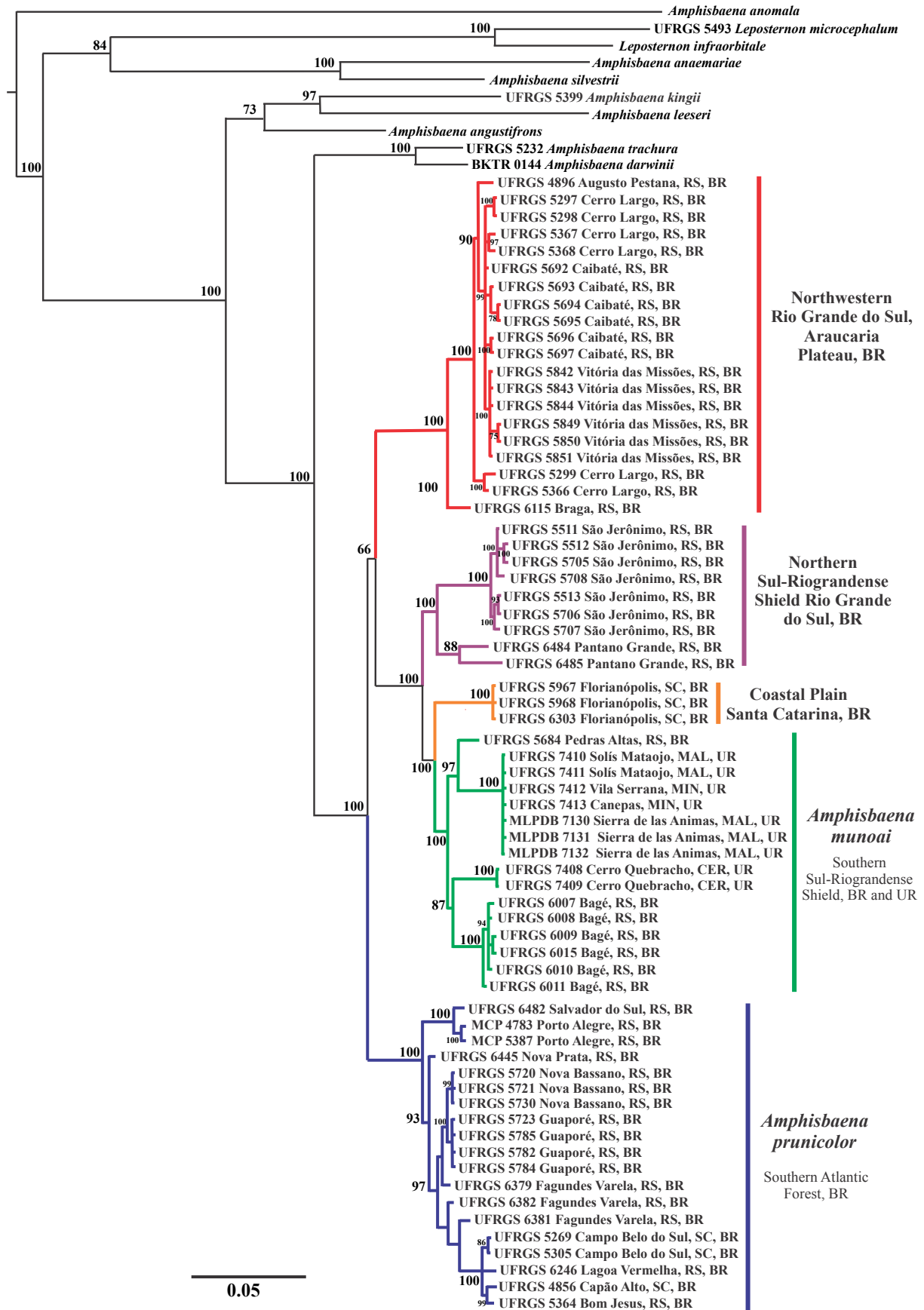


Fig. 1. Bayesian Inference tree based on mitochondrial (16S, CYTB and ND2) and nuclear (NT3) genes concatenated of *Amphisbaena* spp. related to *Amphisbaena munoai* from southern Brazil and Uruguay. Node values represent posterior probability in percentage.

Table 1
Net among group mean distance between *Amphisbaena* spp. Values below the diagonal are Tamura Nei corrected p-distance of mtDNA concatenated plus respective standard error, calculated using 1000 bootstrap replicates. Values above diagonal are Tamura-Nei corrected p-distance of 16S rDNA plus respective standard error, calculated using 1000 bootstrap replicates. Aa: *Amphisbaena anaemariae*; Ad: *A. darwinii*; AF: Southern Atlantic Forest (*Amphisbaena prunicolor*); Ag: *A. angustifrons*; Ak: *A. kingii*; Al: *A. leeseri*; Ao: *A. anomala*; As: *A. silvestrii*; At: *A. trachura*; CP: coastal plain of Santa Catarina state; Lm: *Leposternon microcephalum*; Li: *L. infraorbitale*; NSR: northern region of sul-riograndense Shield Rio Grande do Sul state; NW: northwestern of Rio Grande do Sul state; SSR: southern region of sul-riograndense shield in Brazil and Uruguay (*Amphisbaena munoai*).

	AF	NW	NSR	CP	SSR	At	Ad	Ag	Ak	Aa	Al	As	Lm	Li	Ao
AF		0.051 (0.01)	0.049 (0.01)	0.045 (0.01)	0.050 (0.01)	0.041 (0.01)	0.067 (0.01)	0.089 (0.01)	0.099 (0.02)	0.194 (0.03)	0.139 (0.02)	0.181 (0.02)	0.165 (0.02)	0.172 (0.02)	0.172 (0.02)
NW	0.085 (0.02)		0.069 (0.01)	0.061 (0.01)	0.064 (0.01)	0.050 (0.01)	0.063 (0.01)	0.087 (0.01)	0.125 (0.02)	0.182 (0.02)	0.142 (0.02)	0.207 (0.03)	0.150 (0.02)	0.173 (0.02)	0.164 (0.02)
NSR	0.067 (0.02)	0.062 (0.01)		0.034 (0.01)	0.036 (0.00)	0.066 (0.01)	0.079 (0.01)	0.095 (0.01)	0.112 (0.02)	0.190 (0.02)	0.159 (0.02)	0.199 (0.02)	0.182 (0.02)	0.172 (0.02)	0.173 (0.02)
CP	0.070 (0.02)	0.033 (0.01)	0.047 (0.01)		0.024 (0.00)	0.046 (0.01)	0.058 (0.01)	0.080 (0.01)	0.085 (0.01)	0.198 (0.03)	0.142 (0.02)	0.196 (0.03)	0.166 (0.02)	0.157 (0.02)	0.162 (0.02)
SSR	0.080 (0.02)	0.066 (0.01)	0.071 (0.02)	0.053 (0.01)		0.060 (0.01)	0.074 (0.01)	0.082 (0.01)	0.100 (0.02)	0.195 (0.02)	0.147 (0.02)	0.195 (0.02)	0.179 (0.02)	0.167 (0.02)	0.165 (0.02)
At	0.144 (0.04)	0.126 (0.03)	0.141 (0.03)	0.086 (0.02)	0.139 (0.03)		0.028 (0.01)	0.070 (0.01)	0.101 (0.02)	0.191 (0.03)	0.119 (0.02)	0.189 (0.03)	0.150 (0.02)	0.160 (0.02)	0.146 (0.02)
Ad	0.114 (0.03)	0.127 (0.03)	0.120 (0.03)	0.088 (0.03)	0.136 (0.03)	0.096 (0.03)		0.083 (0.01)	0.111 (0.02)	0.180 (0.02)	0.125 (0.02)	0.194 (0.03)	0.165 (0.02)	0.186 (0.03)	0.151 (0.02)
Ag	0.261 (0.06)	0.251 (0.06)	0.253 (0.06)	0.220 (0.05)	0.265 (0.06)	0.199 (0.04)	0.212 (0.05)		0.110 (0.02)	0.202 (0.03)	0.143 (0.02)	0.188 (0.03)	0.159 (0.02)	0.174 (0.02)	0.171 (0.02)
Ak	0.256 (0.05)	0.256 (0.05)	0.237 (0.05)	0.216 (0.05)	0.242 (0.05)	0.227 (0.05)	0.255 (0.06)	0.262 (0.05)		0.207 (0.03)	0.153 (0.02)	0.180 (0.02)	0.204 (0.03)	0.199 (0.03)	0.200 (0.03)
Aa	0.436 (0.10)	0.388 (0.08)	0.362 (0.08)	0.342 (0.07)	0.397 (0.10)	0.367 (0.08)	0.365 (0.07)	0.377 (0.08)	0.419 (0.08)		0.239 (0.03)	0.230 (0.03)	0.226 (0.03)	0.199 (0.03)	0.175 (0.02)
Al	0.289 (0.07)	0.277 (0.06)	0.297 (0.07)	0.232 (0.05)	0.291 (0.07)	0.263 (0.05)	0.220 (0.05)	0.242 (0.05)	0.299 (0.06)	0.429 (0.09)		0.116 (0.02)	0.220 (0.03)	0.230 (0.03)	0.242 (0.03)
As	0.337 (0.07)	0.348 (0.07)	0.340 (0.07)	0.322 (0.07)	0.354 (0.08)	0.305 (0.06)	0.279 (0.05)	0.371 (0.08)	0.283 (0.06)	0.343 (0.07)	0.366 (0.07)		0.235 (0.03)	0.246 (0.03)	0.239 (0.03)
Lm	0.605 (0.22)	0.553 (0.15)	0.601 (0.22)	0.544 (0.21)	0.583 (0.18)	0.482 (0.11)	0.513 (0.17)	0.515 (0.12)	0.477 (0.10)	0.424 (0.11)	0.516 (0.16)	0.370 (0.09)		0.100 (0.02)	0.216 (0.03)
Lf	0.402 (0.09)	0.385 (0.08)	0.380 (0.08)	0.340 (0.08)	0.396 (0.08)	0.365 (0.07)	0.373 (0.08)	0.392 (0.08)	0.399 (0.08)	0.372 (0.10)	0.350 (0.07)	0.287 (0.06)	0.192 (0.05)		0.232 (0.03)
Ao	0.329 (0.06)	0.267 (0.05)	0.299 (0.05)	0.273 (0.05)	0.277 (0.05)	0.368 (0.08)	0.359 (0.07)	0.381 (0.08)	0.378 (0.08)	0.418 (0.08)	0.446 (0.11)	0.389 (0.08)	0.512 (0.17)	0.378 (0.08)	

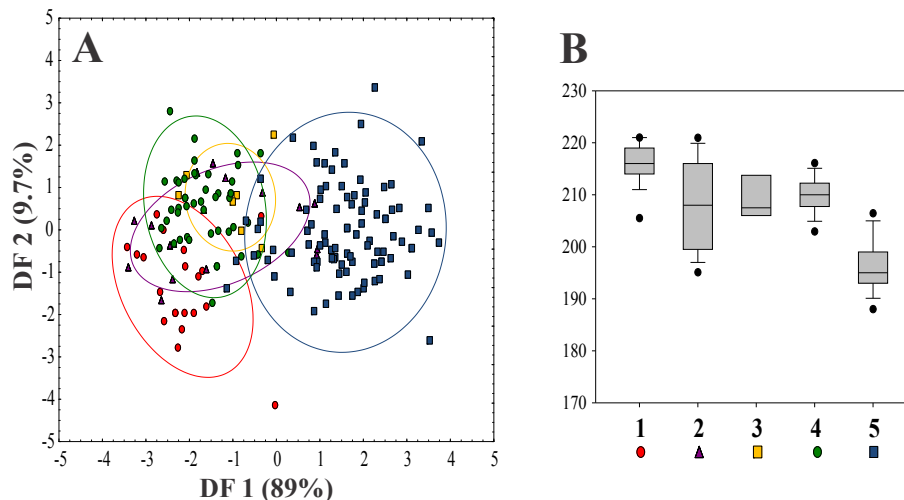


Fig. 2. Descriptive statistics of *Amphisbaena* spp. related to *Amphisbaena munoai* from southern Brazil and Uruguay. Exploratory discriminant function analysis with meristic characters (A). Boxplot from body annuli (B). Taxonomic Units: 1 and red circle: northwestern Rio Grande do Sul (NW); 2 and purple triangle: northern sul-riograndense Shield of Rio Grande do Sul (NSR); 3 and yellow square: Coastal Plain of Santa Catarina (CP); 4 and green circle: *Amphisbaena munoai* (southern sul-siograndense shield, BR and UR); 5 and blue square: *Amphisbaena prunicolor* (southern Atlantic Forest). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

We also observed that *A. prunicolor* can be distinguished from all other samples by its coloration pattern i.e., the specimens showed a dark purplish color with dorsal and ventral segments uniformly pigmented in a checkered pattern (Fig. 4). The other samples had a uniformly light brown color on the dorsum and were gradually fainter on the venter, with no contrasting pattern.

3.3. Taxonomic accounts

Our phylogenetic analysis (monophyletic clades and genetic distance) identified the existence of two known species and three more candidate species associated to various geographical areas in southern Brazil and Uruguay. The morphological characters

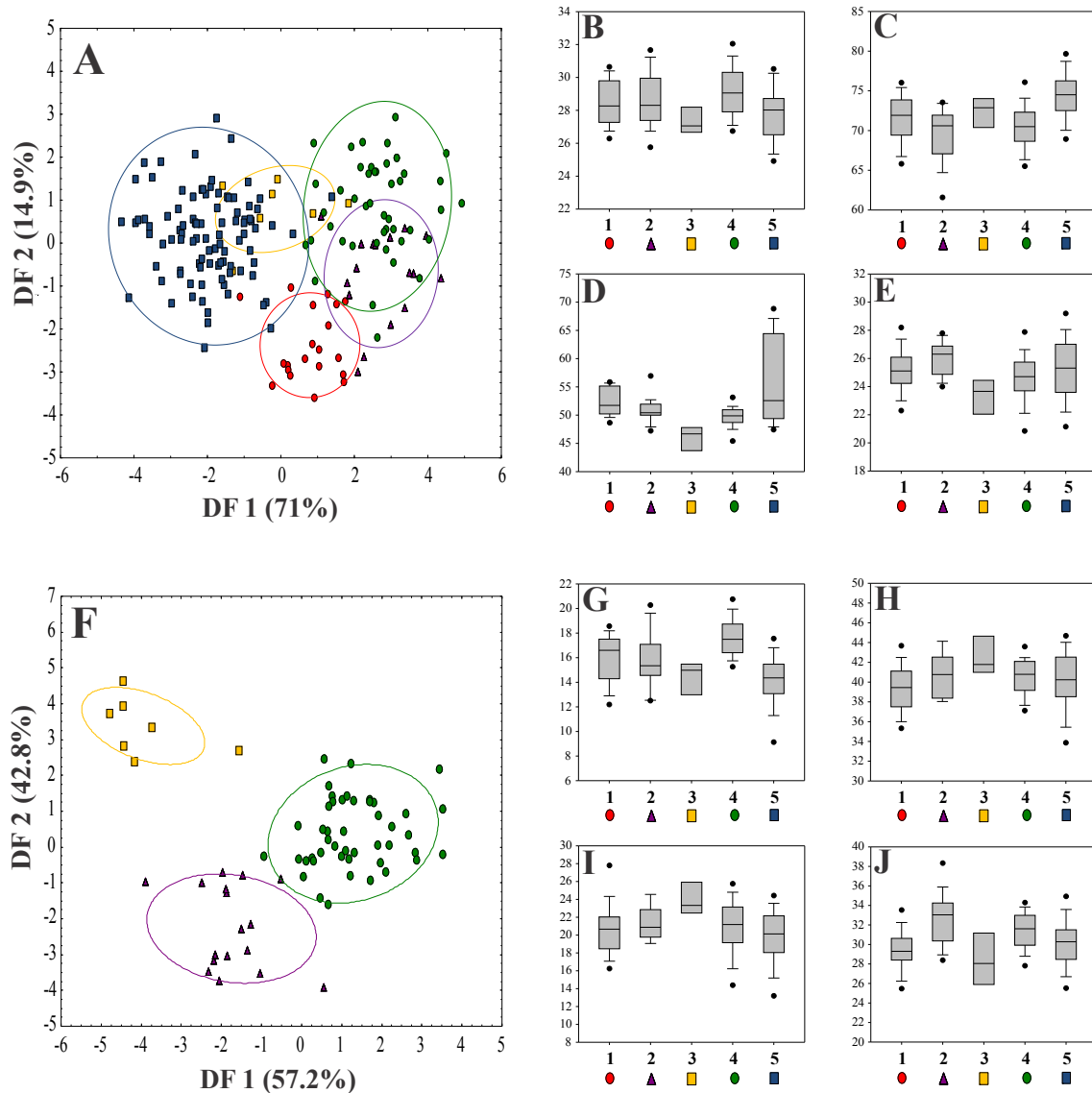


Fig. 3. Descriptive statistics of *Amphisbaena* spp. related to *Amphisbaena munoai* from southern Brazil and Uruguay. Exploratory discriminant function analysis with morphometric characters (A). Boxplots from prefrontal length (B), jaw length (C), snout length (D) and mental width (E). Exploratory discriminant function analysis of morphometric characters for clades CP, SR and *Amphisbaena munoai* (SSR). Boxplot from nasal suture length (G), prefrontal length (H), parietal length (I) and rostral width (J). Taxonomic Units: 1 and red circle: northwestern Rio Grande do Sul (NW); 2 and purple triangle: northern sul-riograndense Shield of Rio Grande do Sul (NSR); 3 and yellow square: Coastal Plain of Santa Catarina (CP); 4 and green circle: *Amphisbaena munoai* (southern sul-riograndense Shield, BR and UR); 5 and blue square: *Amphisbaena prunicolor* (southern Atlantic Forest). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2

Classification matrix for *Amphisbaena* spp. related to *Amphisbaena munoai* from Southern Brazil and Uruguay.

	Percent correct (%)	NW	NSR	CP	SSR	AF
		P = 0.10	P = 0.09	P = 0.03	P = 0.24	P = 0.50
Northwestern Rio Grande do Sul, BR (NW)	90.0	18	0	0	1	1
Northern Sul-Riograndense Shield, BR (SR)	83.3	0	15	0	3	0
Coastal Plain Santa Catarina (CP)	100.0	0	0	7	0	0
<i>Amphisbaena munoai</i> Southern Sul-Riograndense Shield, BR and UR (SSR)	86.9	2	4	0	40	0
<i>Amphisbaena prunicolor</i> Southern Atlantic Forest (AF)	96.8	2	0	0	1	91
Total	92.4	22	19	7	45	92

(meristic and morphometric data) supported the existence of these species. Habitat use (rock outcrops in savannah areas) was similar for *Amphisbaena munoai* and the northern sul-riograndense Shield of the Rio Grande do Sul clade. However, the use of rocks as shelter

is also known for *A. prunicolor*, *A. darwini* and *A. kingii* (personal observation). As demonstrated previously different independent lines of evidence supported the existence of candidate species we will describe of the three new taxa, redescribe *A. munoai* and



Fig. 4. Coloration pattern of *Amphisbaena* spp. related to *Amphisbaena munoai* from southern Brazil and Uruguay. A: *Amphisbaena prunicolor*; B: northwestern Rio Grande do Sul (NW); C: Coastal Plain Santa Catarina (CP); D: northern sul-riograndense Shield Rio Grande do Sul State (NSR). Photos A, C and D by Márcio Borges-Martins; Photo B by Tobias S. Kunz.

comment further on *A. prunicolor* (recently redescribed in Perez et al., 2012).

Aware of the current taxonomic panorama of South American Amphisbaenidae and the lack of a stable phylogeny, we herein present a previous comparison of the new or redescribed taxa and all currently recognized species. Closely related the comparison between the *Amphisbaena darwinii* complex, sensu Gans 1966, including *A. albocingulata*, *A. darwinii*, *A. hoguei*, *A. heterozonata*, *A. nigricauda* and *A. trachura* will be given in each description (see

Table 3 for standard comparison). Because of our ongoing studies, we decided to keep *A. heterozonata* and *A. trachura* as separate species for comparison and not as *A. darwinii* synonyms following Montero (2016).

Comparison: *Amphisbaena munoai*, *A. prunicolor* and the three candidate species are distinguishable from *Amphisbaena anomala* and *Leposternon* species by presenting a round-shaped head (vs. shovel-shaped head). It differs from *Amphisbaena acrobelsi* (Ribeiro, Castro-Mello & Nogueira 2009), *Amphisbaena bilabialata* (Stimson, 1972), *A. kingii* and *Mesobaena* species also by presenting a round-shaped head (vs. keel-shaped head). It differs from *Amphisbaena absaberi* (Strussman & Carvalho, 2001), *Amphisbaena bahiana* Vanzolini, 1964, *Amphisbaena borelli* Peracca, 1897, *Amphisbaena cuiabana* (Strussman & Carvalho, 2001), *Amphisbaena filiformes* Ribeiro, Gomes, Rodrigues, Cintra & Silva, 2016, *Amphisbaena maranhensis* Gomes & Maciel, 2012, *Amphisbaena robertii* Gans, 1964b and *Amphisbaena steindachneri* Strauch, 1881 by presenting a rounded tip of the tail (vs. tip of tail with a vertical keel). It differs from *Amphisbaena caetitensis* Almeida, Freitas, Silva, Valverde, Rodrigues, Pires & Mott, 2018, *Amphisbaena rozei* Lancini, 1963, *Amphisbaena spurelli* Boulenger, 1915 and *Amphisbaena uroxena* Mott, Rodrigues & Freitas e Silva, 2008 by presenting smooth scales in the tip of the tail (vs. tuberculate scales in the tip of the tail).

It differs from *Amphisbaena anaemariae*, *Amphisbaena brevis* Strussman & Mott, 2009, *Amphisbaena caiari* Teixeira-Jr, DalVechio, Neto & Rodrigues, 2014, *Amphisbaena carli* Pinna, mendonça, Bocchigliera & Fernandes, 2010, *Amphisbaena crisae* Vanzolini, 1997, *Amphisbaena dubia* Müller, 1924, *Amphisbaena fuliginosa* Linnaeus, 1758, *Amphisbaena hiata* Monteiro & Céspedes, 2002, *Amphisbaena ignatiana* Vanzolini, 1991a, *Amphisbaena kiriri* Ribeiro, Gomides & Costa, 2018, *Amphisbaena kraoh* (Vanzolini, 1971), *A. leeseri*, *Amphisbaena leucocephala* Peters, 1878, *Amphisbaena litoralis* Roberto, Brito & Ávila, 2014, *Amphisbaena metallurga* Costa, Resende, Teixeira, DalVechio & Clemente, 2015, *Amphisbaena miringoera* Vanzolini, 1971, *Amphisbaena michelli* Procter, 1923, *Amphisbaena neglecta* Dunn & Piatt, 1936, *Amphisbaena persephone* Pinna, Mendonça, Bocchigliera, Fernandes, 2014, *A. silvestrii* and *Amphisbaena stejneri* Strauch, 1881 by presenting four pre-cloacal pores (vs. two, two or three, six, six to ten or 12 pre-cloacal pores).

It differs from *Amphisbaena arenaria* Vanzolini, 1991b, *Amphisbaena carvalhoi* Gans, 1965, *Amphisbaena cegei* Montero, Sáfadez, Álvares, 1997, *Amphisbaena frontalis* Vanzolini, 1991b, *Amphisbaena hastata* Vanzolini, 1991a, *Amphisbaena heathi* Schmidt, 1936, *Amphisbaena hoogmoedi* Oliveira, Vaz-Silva, Santos-Jr, Graboski, Teixeira, DalVechio & Ribeiro, 2018, *Amphisbaena ibijara* Rodrigues, Andrade & Dias-Lima, 2003, *Amphisbaena lumbricalis* Vanzolini,

Table 3

Morphological characters for standard comparison between *Amphisbaena munoai* and related species from *Amphisbaena darwinii* species group (sensu Gans 1966). A: absent; AUT: autonomy scale; BDA: body annuli; CDA: caudal annuli; DMB: dorsal midbody annulus; IL: number of infralabials; P: present; PML: posmalar row; POR: precloacal pores; S: smooth shaped; SL: number of supralabials; SVL: snout vent length; T: tuberculate shaped; TL: tail length; TS: tip of tail shape; VMB: ventral midbody annulus. * holotype information from Vanzolini 1950; ** holotype MNRJ 3305 analyzed by RPerez.

Species	POR	BDA	CDA	AUT	DMB	VMB	SL	IL	PML	TS	SVL + TL (mm)
<i>Amphisbaena albocingulata</i>	4	190–204	24–27	8–9	12–14	16–18	3	3	A	L	121–138 + 15–20
<i>Amphisbaena arenicola</i> sp. nov.	4	199–216	20–22	8–9	12–14	16–18	3 or 4	3	P	L	117–168 + 14–19
<i>Amphisbaena darwinii</i>	2–5	174–195	19–25	7–10	13–19	16–23	3	3	P	L	150–304 + 23–39
<i>Amphisbaena heterozonata</i>	2–6	189–206	15–18	6–8	15–18	18–20	3	3	P	L	150–277 + 14–24
<i>Amphisbaena hoguei</i>	4	177–191	15–19	4–7	10–13	14–18	3	3	P	L	134 + 14 *
<i>Amphisbaena munoai</i>	4	202–218	18–23	5–9	10–14	13–18	3	3	P	L	102–123 + 11–17
<i>Amphisbaena nana</i> sp. nov.	4	195–216	18–22	7–10	12–14	14–17	3	3	P	L	103–152 + 11–18
<i>Amphisbaena nigricauda</i>	4	222–226	19–24	6–9	10	16	3	3	A	L	120 + 16 **
<i>Amphisbaena prunicolor</i>	4	181–215	18–27	7–11	10–17	14–20	3	3	P	L	141–238 + 15–35
<i>Amphisbaena tiaraju</i> sp. nov.	4	204–221	18–25	7–9	10–14	13–16	3	3	P	L	127–183 + 14–20
<i>Amphisbaena trachura</i>	3–4	186–203	18–25	6–9	14–18	16–24	3	3	P	T	150–322 + 18–38

1996, *Amphisbaena medemi* Gans & Mathers, 1977, *Amphisbaena mensae* Castro-Mello, 2000, *Amphisbaena pericensis* Noble, 1921, *Amphisbaena slevini* Schmidt, 1936, *Amphisbaena supernumeraria* Mott, Rodrigues & Santos, 2009 and *Amphisbaena talisiae* Vanzolini, 1995 by the presence of a post-malar row (vs. post-malar row absent). It differs from *Amphisbaena alba* Linnaeus, 1758, *A. angustifrons*, *Amphisbaena cunhai* Hoogmoed & Ávila-Pires, 1991, *Amphisbaena occidentalis* Cope, 1875 and *Amphisbaena ridleyi* Boulenger, 1890 by presenting an autotomy scale visible externally (vs. autotomy scale not visible externally).

It differs from *Amphisbaena arda* Rodrigues, 2003, *Amphisbaena bedai* (Vanzolini, 1991c), *Amphisbaena gracilis* Strauch, 1881, *Amphisbaena plumbea* Gray, 1872, *Amphisbaena polygrammica* Werner, 1901, *Amphisbaena pretei* Duméril & Bibron, 1839, *Amphisbaena sanctaeritae* Vanzolini, 1994, *Amphisbaena saxosa* (Castro-Mello, 2003), *Amphisbaena townsendi* Stejneger, 1911 and *Amphisbaena vanzolini* Gans, 1963b by presenting 221 or less body annuli (vs. 224 or more body annuli). It differs from *Amphisbaena myersi* Hoogmoed, 1989 and *Amphisbaena tragorrhectes* Vanzolini, 1971 by presenting 27 or less caudal annuli (vs. 28 or more caudal annuli). It differs from *Amphisbaena bolivica* Mertens, 1929, *Amphisbaena brasiliiana* (Gray, 1865), *Amphisbaena camura* Cope, 1862, and *Amphisbaena vermicularis* Wagler, 1824 by presenting 17 or less dorsal segments in the midbody annulus (vs. 18 or more dorsal segments in the midbody annulus). It differs from *Amphisbaena slateri* Boulenger, 1907 by presenting two rows with a variable number of post-genial shields (vs. one row with two elongated post-genial shields). It differs from *Amphisbaena mertensii* Strauch, 1881 by presenting parietal shields quadrangular and smaller than frontal shields (vs. parietal shields enlarged laterally and with similar size of the frontal shields).

3.3.1. Description of *Amphisbaena tiaraju* sp. nov.

Amphisbaena munoai—Perez et al., 2012: 5 (in part).

Holotype: UFRGS 5370 from Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil (28° 8' 30"S, 54° 49' 59.9"O). Collected by Rafael L. Balestrin, Simone B. Leonardi and Luis Fernando M. da Fonte on 30 August 2009 (Fig. 5).

Paratypes. UFRGS 4896* Augusto Pestana, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5037, 5039, 5040, 5041, 5297*, 5298*, 5299*, 5366*, 5367*, 5368*, 5371, 5999 Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5692*, 5693*, 5694*, 5695*, 5696*, 5697* Caibaté, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5842*, 5843*, 5844*, 5849*, 5850*, 5851* Vitória das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

Referred material: UFRGS 6115* Braga, Rio Grande do Sul, Brazil.

Specimens indicated with an asterisk where included on genetic analysis.

Etymology: The species is named after the South-American Indigenous warrior Sepé Tiaraju, supposedly born around 1723, leader of the “Sete Povos das Missões”, a set of seven indigenous settlements founded by the Spanish Jesuits in northwest Rio Grande do Sul, Brazil. Sepé Tiaraju is a Guarani hero, symbol of indigenous sentiment of liberty, but he was also part of the gaucho folklore traditions, immortalized in many regional literary works. He died in the Caiboaté battle against the Portuguese and Spanish army in 1756, together with other 1500 Guaranis. He now is officially recognized as a hero at regional (State Law 12.366, Rio Grande do Sul, Brazil) and federal level (Brazilian Federal Law 12.032/09) by its importance in the formation of the southern Brazilian frontiers. The specific epithet is a noun in apposition of the official Portuguese spelling. The tribute was a reference to the restricted distribution of the species to the “Missões” region.

Diagnosis: *Amphisbaena tiaraju* sp. nov. is distinguished from other species of *Amphisbaena* by the following character combination: (1) rounded head; (2) smooth segments at the tip of the tail;



Fig. 5. Holotype of *Amphisbaena tiaraju* sp. nov., UFRGS 5370, Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Dorsal, lateral and ventral view of the head. Scale = 1 mm.

(3) four pre-cloacal pores; (4) 204–221 body annuli; (5) 18–25 caudal annuli; (6) caudal autotomy seen externally from 7–9 caudal annuli; (7) presence of postmalar row; (8) 10–14 dorsal segments on the mid-body annulus; (9) distance between ocular shields representing 35%–43% of the head width; (10) dark brown colouration with uniform shield pigmentation.

Comparison: *Amphisbaena tiaraju* sp. nov. is distinguished from *A. albocingulata* by presenting the post-malar row (vs. post-malar row absent). It differs from *A. darwinii* and *A. hoguei* by presenting 204–221 body annuli (vs. 178–199 and 177–191 body annuli, respectively). It differs from *A. heterozonata* by presenting 18–25 caudal annuli (vs. 13–17 caudal annuli). It differs from *A. trachura* by presenting smooth scales in the tip of the tail (vs. tuberculate scales). Differs from *A. nigricauda* by presenting a uniform coloration in the tip of the tail (vs. a darker coloration in the tip of the tail). Differs from *A. prunicolor* by presenting a dark brown colouration with uniform shield pigmentation (vs. checkered pattern colouration). Differs from *A. munoai* by presenting a larger distance between ocular shields, varying between 35.3% and 42.7% (\bar{x} =

39.5 ± 2.3) of head length (HL) (vs. 28.7–37.5, \bar{x} = 32.7 ± 0.9), a dark brown uniform coloration (vs. light brown uniform coloration) and by 6.4% of 16S rDNA mean genetic distance.

Holotype description: Adult male, 158.9 mm total length [snout-vent-length (SVL) 142 mm and caudal length 16.9 mm (11.9% SVL)]. Slender body, diameter 3.5 mm (2.4% SVL). Head length (HL) 4.5 mm (3.2% SVL), head width (HW) 3.2 mm (2.3% SVL). Snout 2.28 mm (50.2% HL). Triangular rostral shield, barely visible dorsally, with height representing 21.6% HL. One pair of quadrangular nasal shields, nasal suture 0.8 mm (18.3% HL). Nostrils arranged in the lateral portion of the nasal shields. Rounded suture between nasals and prefrontals shields. One pair of quadrangular prefrontal shields relatively large with 1.6 mm length (36.3% HL) and 1.23 mm width (27.1% HL). Frontal shields longer than wide, smaller than prefrontal, with 1.4 mm length (31.5% HL) and 0.9 mm width (20.7% HL). Posterior suture of frontals forming an open 'V'. A row of parietal shields well differentiated from other body shields, representing the first ventral body annulus. Quadrangular central parietals with 1 mm length (22% HL) and 0.9 mm width (19.8% HL). A row of occipital shields present. Small and rhomboid ocular shield with 0.9 mm length (20.5% HL) and 0.8 mm width (18.7% HL); distance between ocular shields 1.83 mm (56.6% HW). Widened post-ocular shield with 1.3 mm length (27.7% HL) and 0.9 mm width (20% HL). One temporal shield and one post-supralabial shield, both quadrangular. Three supralabial shields of equivalent size. Three infralabial shields of distinct forms: first smaller and quadrangular, second wider and deeper, third elongated and rectangular; the three together occupy 2.9 mm of the side of the mouth. Mental shield with an inverted trapezoidal shape of 0.9 mm length (19.6% HL) and 1.1 mm width (24.2% HL). Postmental shield heptagonal of 1.2 mm length (25.8% HL) and 1 mm width (22.9% HL). One row with two postgenital shields. One pair of triangular malar shields of 1 mm inner length (22% HL), 0.5 mm outer length (10% HL) and 1.1 mm width (24% HL). Row with nine postmalar shields. Body annuli 220. Caudal annuli 22, caudal autotomy present on the eighth annulus, 22 segments on the fourth caudal annulus, tip of the tail smooth. Twelve dorsal segments and 14 ventral segments on the midbody annulus. Four precloacal pores arranged in sequence on the posterior portion of the segments of the last ventral annulus. Cloacal plate with six precloacal and ten postcloacal shields. Dark brown color, pale in the venter, uniform pigmentation on the shields. On the side of the head, specimen shows no color on supralabial, temporal and post-supralabial shields. The color of the venter is apparent near the lateral sulcus, and pale on the center. The cloacal plate is pigmented and the colors on the tail becomes darker.

Variation: Total length varies between 142.7 and 201.2 mm (\bar{x} = 173.7 mm ± 15.6), snout-vent length (SVL) varies between 127 and 183 mm (\bar{x} = 157.3 mm ± 13.7), tail length varies between 14 and 19.9 mm (\bar{x} = 17.4 mm ± 15.7; N = 18). Specimens with slender body, diameter varying between 2.0 and 3.2% of SVL (\bar{x} = 2.6 ± 0.3). Head length varies between 2.5 and 3.5% of SVL (\bar{x} = 3 ± 0.2%), head width varies between 1.8 and 2.5% of SVL (\bar{x} = 2 ± 0.2%). Variation in width between ocular shields 1.5–2.1 mm (\bar{x} = 58.7 ± 2.8% HW). Body annuli vary between 204 and 221 (\bar{x} = 215.8 ± 3.9). Caudal annuli vary between 18 and 25 (\bar{x} = 20.7 ± 1.5; N = 19), caudal autotomy between 7 and 9 annulus (\bar{x} = 8.2 ± 0.6; N = 19), segments on the fourth caudal annulus varying between 19 and 25 (\bar{x} = 21.8 ± 1.5). Dorsal segments of the midbody annulus vary between 10 and 14 (\bar{x} = 11.8 ± 0.9) and ventral segments vary between 13 and 16 (\bar{x} = 14.7 ± 0.9).

Distribution: *Amphisbaena tiaraju* sp. nov. is known only from five municipalities in the State of Rio Grande do Sul, Brazil at altitudes ranging between 50 and 250 m (Fig. 6). These localities are in the northwestern portion of the State, in the “Missões”

physiographic region, an area of ecological tension between the Atlantic Forest and the Subtropical Grasslands. The region was covered originally with seasonal deciduous forest and natural grasslands, but is now severely impacted by human occupation mainly due to agriculture and cattle raising.

3.3.2. Description of *Amphisbaena nana* sp. nov.

Amphisbaena munoai— Gans, 1966: 243 (in part).

Amphisbaena munoai— Perez et al., 2012: 5 (in part).

Holotype: UFRGS 5705* from São Jerônimo, State of Rio Grande do Sul, Brazil (29° 57'S, 51° 43'W). Collected by Márcio Borges-Martins and team, on 3 July 2010 (Fig. 7).

Paratypes: UFRGS 5511*, 5512*, 5513*, 5614, 5616, 5704 and 5706* São Jerônimo, Rio Grande do Sul state, Brazil.

Referred material: MCP 11790, 12006 Dom Feliciano, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 14572, 14573, 14574, 14576 Encruzilhada do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 13317, 13318 Mariana Pimental, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 6248* Nova Santa Rita, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 6484*, 6485* Pantano Grande, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5707*, 5708*, 6125, MCP 15118, 15351, 15788, 16787 São Jerônimo, Rio Grande do Sul, Brazil; photographic record Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil.

Specimens indicated with an asterisk where included on genetic analysis.

Etymology: The specific epithet *nana* is an adjective derived from the Latin word *nanus*, meaning 'dwarf', and is a reference to the small size of this species, the smallest within the *Amphisbaena darwini*-Group.

Diagnosis: *Amphisbaena nana* sp. nov. is distinguished from other species of *Amphisbaena* by the following character combination: (1) rounded head; (2) smooth segments at the tip of the tail; (3) four pre-cloacal pores; (4) 195–216 body annuli; (5) caudal autotomy seen externally from 7–10 caudal annuli; (6) presence of postmalar shields; (7) parental shields differentiated from body shields; (8) light brown coloration with uniform shield pigmentation.

Comparison: *Amphisbaena nana* sp. nov. is distinguished from *A. albocingulata* by presenting the post-malar row (vs. post-malar row absent). Differs from *A. hoguei* by presenting 195–216 body annuli (vs. 177–191 body annuli). It differs from *A. heterozonata* by bearing 18–22 caudal annuli (vs. 13–17 caudal annuli). It differs from *A. nigricauda* by having a uniform coloration on the tail tip (vs. a darker coloration on tail tip). Differs from *A. trachura* by presenting smooth scales on tail tip (vs. tuberculate scales). It differs from *A. darwini* by presenting a slender body and small SVL in adults, 103–152 mm (vs. sturdy body with long SVL in adults, 150–304 mm). Differs from *A. prunicolor* by presenting a uniform coloration pattern (vs. checkered coloration pattern). It differs from *A. munoai* by presenting a short frontal shield, with similar size of parietal shields, varying between 18.7 and 28.7% (\bar{x} = 23.9 ± 2.6) of head length (HL) (vs. 25.9–35.8; \bar{x} = 27.7 ± 1.0, with larger size than parietal shields) and 3.6% of 16S rDNA mean genetic distance. Differs from *A. tiaraju* sp. nov. by presenting a smaller frontal shield, varying between 18.7 and 28.7% (\bar{x} = 24.5 ± 2.8) of (HL) (vs. 28.5–34.2%; \bar{x} = 30.6 ± 1.9) and by 6.9% of 16S rDNA mean genetic distance.

Holotype description: Adult male, 130.1 mm total length [snout-vent-length (SVL) 118 mm and caudal length 15 mm (12.7% SVL)]. Slender body, diameter 3.1 mm (2.7% SVL). Head length (HL) 3.8 mm (3.2% SVL), head width (HW) 1.1 mm (0.4% SVL). Snout 2 mm (52.7% HL). Triangular rostral shield, barely visible dorsally, with height representing 32.7% HL. One pair of quadrangular nasal shields, nasal suture 0.6 mm (16.5% HL). Nostrils arranged in the lateral portion of the nasal shields. One pair of relatively small prefrontal shields with 1.4 mm length (36.1% HL) and 1.1 mm width

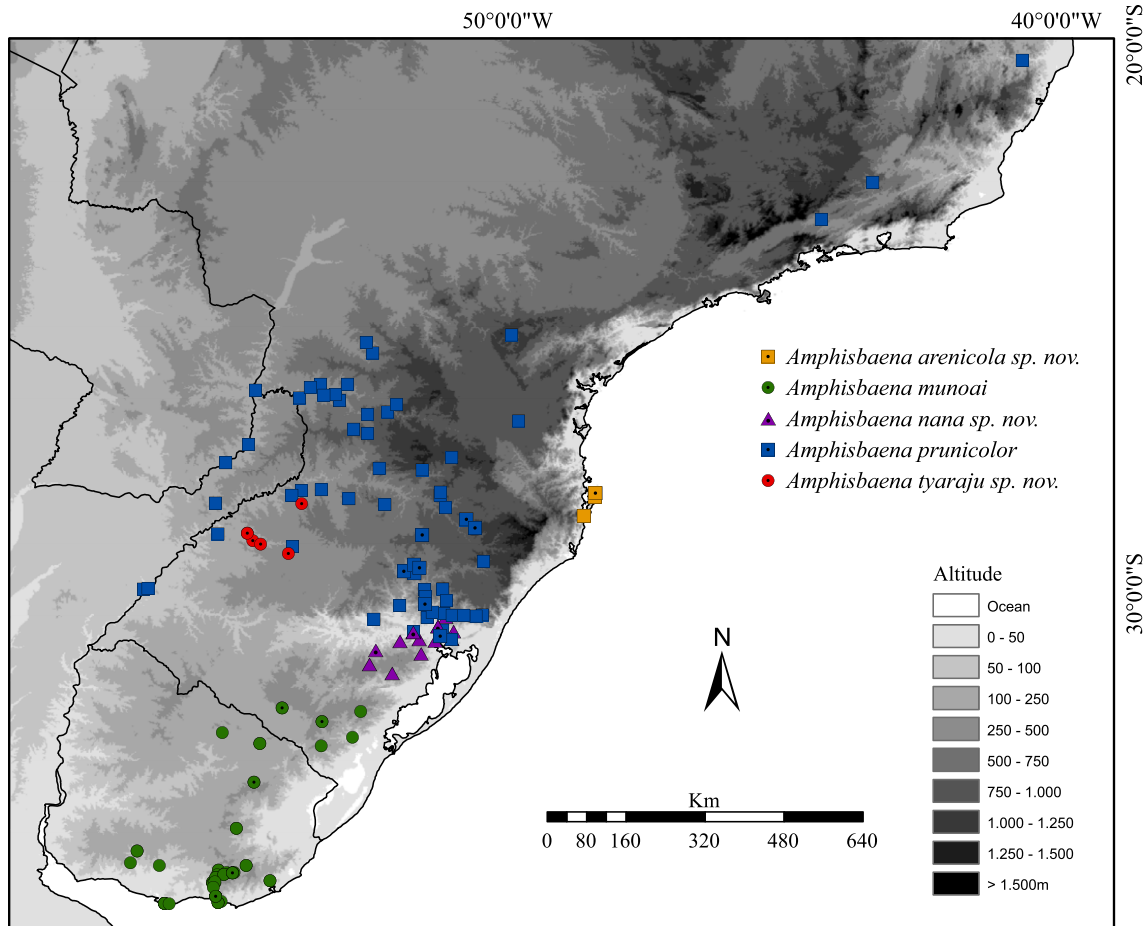


Fig. 6. Geographical distribution of *Amphisbaena* spp. related to *Amphisbaena munoai* from Southern Brazil and Uruguay.

(29.8% HL). Frontal shields longer than wide, with 0.9 mm length (23.1% HL) and 1.3 mm width (34.8% HL). A row of parietal shields well differentiated from other body shields, representing the first ventral body annulus. Quadrangular central parietals with 0.9 mm length (24.2% HL) and 0.8 mm width (20.7% HL). A row of occipital shields presents. Ocular shield small, longer than wide with 1 mm length (25.5% HL) and 0.9 mm height (22.9% HL); distance between ocular shields of 1.25 mm (33.2% HW). Widened post-ocular shield with 1 mm length (26.6% HL) and 0.7 mm width (18.6% HL). One temporal shield and three supralabial shields of equivalent size. Three infralabial shields of distinct forms: first smaller and quadrangular, second wider and deeper, third elongated and rectangular; the three together occupy 2.6 mm of the side of the mouth. Mental shield with an inverted trapezoidal shape, longer than wide with 0.8 mm length (21% HL) and 1 mm width (26.9% HL). Postmental shield larger than mental shield, with 1.2 mm length (30.9% HL) and 0.9 mm width (23.7% HL). Two rows postgenial shields, first with two large shields and second with two small shields. One pair of malar shields of 0.9 mm inner length (23.1% HL), 0.4 mm outer lengths (10.4% HL) and 0.8 mm width (20.5% HL). Row with eight postmalar shields. Body annuli 203. Caudal annuli 21, caudal autotomy present on the ninth annulus, 23 segments on the fourth caudal annulus, tip of the tail smooth. Twelve dorsal segments and 16 ventral segments on the midbody annulus. Four precloacal pores arranged in sequence on the posterior portion of the segments of the last ventral annulus. Cloacal plate with six precloacal and thirteen postcloacal shields. Shields uniformly

pigmented, light brown color with a pinkish tone at the dorsal and ventral regions.

Variation: Total length varies between 142.7 and 201.2 mm ($\bar{x} = 173.7 \text{ mm} \pm 15.6$), snout-vent length (SVL) varies between 103 and 152 mm ($\bar{x} = 124 \text{ mm} \pm 12.2$), tail length varies between 11.7 and 17.9 mm ($\bar{x} = 14.3 \text{ mm} \pm 1.8$). Specimens with slender body, diameter varying between 2.3 and 3.3% of SVL ($\bar{x} = 2.8 \pm 0.3$). Head length varies between 2.6 and 3.3% of SVL ($\bar{x} = 2.8 \pm 0.3$), head width varies between 1.8 and 2.5% of SVL ($\bar{x} = 2.2 \pm 0.2$). Body annuli vary between 195 and 216 ($\bar{x} = 208.1 \pm 8.7$). Caudal annuli vary between 18 and 22 ($\bar{x} = 20.4 \pm 1.0$), caudal autotomy between 7 and 10 annulus ($\bar{x} = 8.3 \pm 0.7$), segments on the fourth caudal annulus varying between 19 and 26 ($\bar{x} = 22.5 \pm 1.6$). Dorsal segments of the mid-body annulus vary between 12 and 14 ($\bar{x} = 12.2 \pm 0.6$) and ventral segments vary between 14 and 17 ($\bar{x} = 15.7 \pm 0.7$).

Distribution: *Amphisbaena nana* sp. nov. is distributed in the central depression of Rio Grande do Sul state, along the drainages of Taquari and Jacuí Rivers in altitudes of ca. 100 m including anthropogenic habitats near Porto Alegre and adjacent municipalities. It is also found in the eastern Sul-riograndense shield, north to the Camaquã River, in altitudes of ca. 500 m (Fig. 6). Most of its distribution is associated to the northern areas of the Pelotas Batholith in the “Cinturão Dom Feliciano” geotectonic unit. The region is originally covered by a mosaic of Seasonal Semideciduous Forest and natural grasslands in a contact zone between the Atlantic Forest and the Pampa.

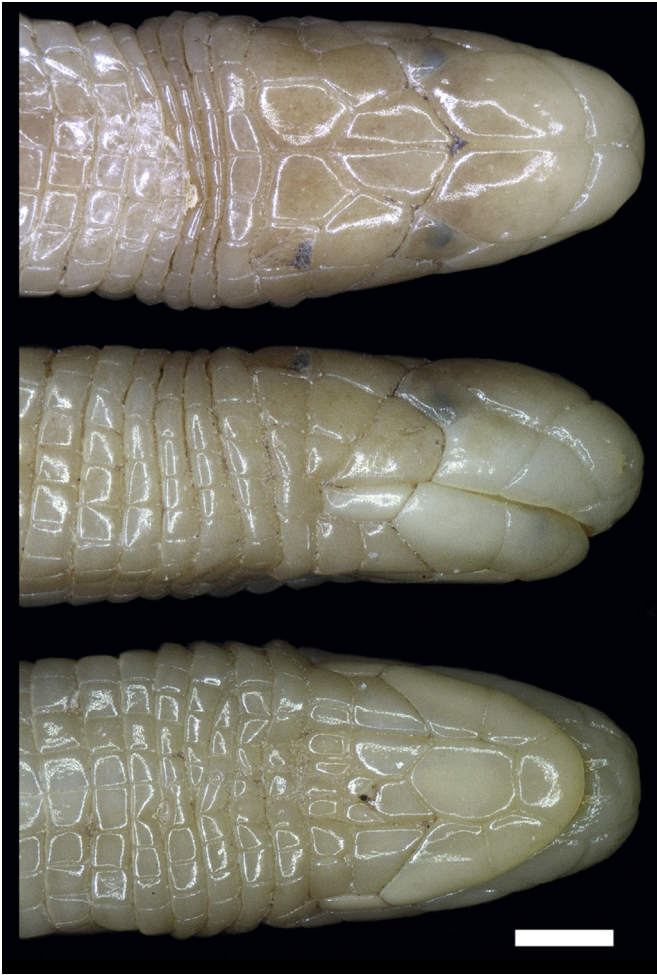


Fig. 7. Holotype of *Amphisbaena nana* sp. nov., UFRGS 5705, São Jerônimo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Dorsal, lateral and ventral view of the head. Scale = 1 mm.



Fig. 8. Holotype of *Amphisbaena arenicola* sp. nov., UFRGS 5892, Florianópolis, State of Santa Catarina, Brazil. Dorsal, lateral and ventral view of the head. Scale = 1 mm.

3.3.3. Description of *Amphisbaena arenicola* sp. nov.

Holotype: UFRGS 5892 from Praia dos Ingleses, municipality of Florianópolis, State of Santa Catarina, Brazil (27° 26'S, 48° 23'O). Collected by Tobias S. Kunz (Fig. 8).

Paratypes: UFRGS 5893, 5894, 5967* Ingleses, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; **Referred material:** CHUFSC 668, 683 Rio Vermelho, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; CHUFSC 696; UFRGS 5968*, 6303*, 6615*, 6616*, 6702* Ingleses, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; CHUFSC 856 Baixada do Macaímbu, Pinheira, Santa Catarina, Brazil.

Specimens indicated with an asterisk where included on genetic analysis.

Etymology: The specific epithet *arenicola* is an adjective derived from the Latin word for living in the sand. This name was chosen because this is the only taxon of the species-group inhabiting mainly sandy habitats (Restinga areas).

Diagnosis: *Amphisbaena arenicola* sp. nov. is distinguished from other *Amphisbaena* by the following character combination: (1) rounded head; (2) smooth segments at the tip of the tail; (3) four pre-cloacal pores; (4) 199–216 body annuli; (5) caudal autotomy seen externally from 8–9 caudal annuli; (6) 3/3 or 4/4 supralabial shields; (7) short snout, representing less than 50% of head length.

Comparison: *Amphisbaena arenicola* sp. nov. is distinguished from *A. albocingulata* by presenting the post-malar row (vs. post-

malar row absent). Differs from *A. hogei* by presenting 199–216 body annuli (vs. 177–191 body annuli). It differs from *A. heterozonata* by presenting 20–22 caudal annuli (vs. 13–17 caudal annuli). It differs from *A. nigricauda* by having a uniformly colored tail tip (vs. a darkly colored tail tip). Differs from *A. trachura* by presenting smooth scales on tail tip (vs. tuberculate scales). It differs from *A. darwinii* by presenting a slender body and smaller adult SVL ranging between 117 and 178 mm (vs. sturdy body with long SVL in adults, 150–304 mm). Differs from *A. prunicolor* by presenting a uniform coloration pattern (vs. checkered coloration pattern). Differs from *A. tiaraju* sp. nov. by presenting a larger number of ventral segments in the midbody annulus, varying between 16 and 18 (vs. 13–16) and a smaller snout, varying between 42.6 and 47.9% ($\bar{x} = 45.9 \pm 1.9$) of head length (HL) (vs. 48.5–55.8%, $\bar{x} = 52.4 \pm 3.1$ of HL). It differs from *A. munoai* by presenting 3/3 or 4/4 supralabial shields (vs. always 3/3 supralabial shields) and smaller nasal suture varying between 12.5 and 17.2% ($\bar{x} = 14.7 \pm 1.5$) of HL (vs. 14.1–20.8, $\bar{x} = 17.6 \pm 1.5$ of HL). It differs from *A. nana* sp. nov. by presenting a widened ocular shield, with larger size than ocular shield, varying between 22.0 and 24.4% ($\bar{x} = 23.1 \pm 0.9$) of

head length (HL) (vs. 17.7–22.8; \bar{x} = 21.3 ± 1.3; with similar size of the ocular shield) and by 3.4% of 16S rDNA mean genetic distance.

Holotype description: Adult male, 147.6 mm total length [snout-vent-length (SVL) 130 mm and caudal length 17.6 mm (13.5% SVL)]. Slender body, diameter 4.1 mm (3.1% SVL). Head length (HL) 4.9 mm (3.8% SVL), head width (HW) 3.2 mm (2.5% SVL). Snout 2.4 (47.8% HL). Triangular rostral shield, barely visible dorsally, with height representing 21.1% HL. One pair of quadrangular nasal shields, nasal suture 0.7 mm (15% HL). Nostrils arranged in the lateral portion of the nasal shields. Rounded suture between nasals and prefrontal shields. One pair of quadrangular prefrontal shields relatively large with 2.2 mm length (45.1% HL) and 1.4 mm width (28% HL). Frontal shields longer than wide, smaller than prefrontal, with 1.4 mm length (27.3% HL) and 1 mm width (19.2% HL). Posterior suture of frontals forming an open 'V' shape. A row of parietal shields well differentiated from other body shields, representing the first ventral body annulus. Quadrangular central parietals with 1.1 mm length (22.5% HL) and 0.9 mm width (18.4% HL). A row of occipital shields presents. Small and rhomboid ocular shield with 1.3 mm length (27.1% HL) and 1.1 mm height (23.1% HL). Post-ocular shield with size similar to ocular shield, with 1.2 mm length (25.1% HL) and 0.9 mm width (18.8% HL). One temporal shield quadrangular. Three supralabial shields of equivalent size and fourth quadrangular and smaller than others. Three infralabial shields of distinct forms: first smaller and quadrangular, second wider and deeper, third elongated and rectangular; the three together occupy 3.4 mm of the side of the mouth. Mental shield with an inverted trapezoidal shape, short with 0.9 mm length (19.9% HL) and 1.1 mm width (23.5% HL). Post-mental shield heptagonal, longer than wide, with 1.2 mm length (28.2% HL) and 1 mm width (23.3% HL). Two rows of postgenial shields, first with two and second with three smaller shields. One pair of triangular malar shields of 1 mm inner length (22% HL), 0.5 mm outer lengths (10% HL) and 1.1 mm width (24% HL). A row with six postmalar shields. Body annuli 206. Caudal annuli 21, caudal autotomy present on the ninth annulus, 22 segments on the fourth caudal annulus, tip of the tail smooth. Fourteen dorsal segments and 16 ventral segments on the midbody annulus. Four preloacal pores arranged in sequence on the posterior portion of the segments of the last ventral annulus. Cloacal plate with six preloacal and eleven postloacal shields. Light brown color, pale in the venter, uniform pigmentation on the shields.

Variation: Total length varies between 142.7 and 201.2 mm (\bar{x} = 173.7 mm ± 15.6), SVL varies between 117 and 168 mm (\bar{x} = 143 mm ± 18.9), tail length varies between 14.6 and 18.5 mm (\bar{x} = 17.4 mm ± 1.9). Specimens with slender body, diameter varying between 2.4 and 3.1% of SVL (\bar{x} = 2.6 ± 0.3). Head elongated, length varying between 3.0 and 3.8% of SVL (\bar{x} = 3.4 ± 0.3%), head width varies between 2.0 and 2.5% of SVL (\bar{x} = 2.2 ± 0.2%). Short snout, representing 42.6–47.8% of head length (\bar{x} = 45.7 ± 2.3). Body annuli vary between 199 and 216 (\bar{x} = 208.8 ± 5.9). Caudal annuli vary between 20 and 22 (\bar{x} = 21 ± 0.6), caudal autotomy between 8 and 9 annulus (\bar{x} = 8.7 ± 0.5), segments on the fourth caudal annulus varying between 24 and 26 (\bar{x} = 24.7 ± 0.7). Dorsal segments of the mid-body annulus vary between 12 and 14 (\bar{x} = 13.7 ± 0.5) and ventral segments vary between 16 and 18 (\bar{x} = 16.7 ± 0.7).

Distribution: *Amphisbaena arenicola* sp. nov. is known only from two localities in the State of Santa Catarina, Brazil, in the Island of Santa Catarina (Florianópolis) and vicinities (Pinheira) associated with sandy soils of coastal Restingas (Fig. 6). It is the only species from the group distributed in coastal areas. Its distribution is disjunct about 300 km straight-line from the nearest record of *A. nana* sp. nov., and about 550 km from the nearest record of its sister species, *A. munoai*.

3.3.4. Redescription of *Amphisbaena munoai* Klappenbach, 1960

Amphisbaena munoai Klappenbach, 1960: 3. Localidade tipo: Cerro de Animas, Departamento de Maldonado, Uruguay.

Amphisbaena munoai – Gans, 1966: 243.

Amphisbaena munoai– Perez et al., 2012: 5 (in part).

Holotype: MNHN 587 Cerro de Animas, Maldonado Department, Uruguay (34° 42' S 55° 19' W).

Paratypes: MNHN 173C, 181A, 181C, 583A–583E, 586, 588, 589, 590, 591; 718A, 862A–862C, 863, 865A, 865C, 3059 (ex 173D), 3060 (ex 181E), 3061 (ex 181D), 3062 (ex 181F); 3063 (ex 718B), 3065 (ex 865B); MNRJ 3307 (ex MNHN 181B); USNM 145301 (ex MNHN 173A), 145302 (ex MNHN 173B) Cerro de Animas, Maldonado Department, Uruguay; MNHN 178A, 182, 3058 (ex 178B) Cerro San Antonio, Piriápolis, Maldonado Department, Uruguay; MNHN 716 Aguas Blancas, Lavalleja Department, Uruguay; MNHN 861A, 3064 (ex 861B) Zapicán, Lavalleja Department, Uruguay; ZVC-R 37-1 Cerro de Arequita, Lavalleja Department, Uruguay; MNHN 714 Carpintería, Rivera Department, Uruguay; MNHN 864 Sierras de Aceguá, Cerro Largo Department, Uruguay; ZVC-R 38, 142 Cerro, Montevideo Department, Uruguay.

Referred material: UFRGS 6007*, 6008*, 6009*, 6010*, 6011*, 6014, 6015* Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5943 Canguçu, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5684* Pedras Altas, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 7408*, 7409*, Cerro Quebracho, Cerro Largo, Uruguay; MNHN 864 Sierras de Aceguá, Cerro Largo, Uruguay; ZVC-R 4101 Ruta 8 km 128, Lavalleja, Uruguay; MNHN 3067, 3069 Abra de la Coronilla, Lavalleja, Uruguay; MNHN 3169 Abra de Zabaleta, Lavalleja, Uruguay; MNHN, 3076, 3077, 3078, 3080 Aguas Blancas, Lavalleja, Uruguay; MNHN 5666 Arroio Cerro Blanco, Lavalleja, Uruguay; ZVC-R 37–1, 1532 Cerro de Arequita, Lavalleja, Uruguay; MNHN 5699 Cerros Blancos, Lavalleja, Uruguay; ZVC-R 2417; MNHN 6144 Cerro Verdún, Lavalleja, Uruguay; MNHN 3161 Cerro Penitente, Lavalleja, Uruguay; MNHN 934, 1437, 3088 Parque Salus, Lavalleja, Uruguay; MNHN 1438, 3070 Sierra de Minas, Lavalleja, Uruguay; ZVC-R 3878 Cerro Barboza, Maldonado, Uruguay; MNHN 1100 Cerro Sencioni, Maldonado, Uruguay; MNHN 779, 933, 1651, 3074, 3089, 3095, 3104; MCP 14865; ZVC-R 1511 Cerro de Animas, Maldonado, Uruguay; MNHN 5974 Cerro de las Espinas, Maldonado, Uruguay; MNHN 1101 Cerro San Antonio, Piriápolis, Maldonado, Uruguay; MNHN 1100, 3095, 3096, 3097, 3098, 3099, 3100, 3101 Cerro Pan de Azucar, Maldonado, Uruguay; MLPDB 7130*, 7131*, 7132*; ZVC-R 3802, 3840, 4356 Sierra de las Animas, Maldonado, Uruguay; UFRGS 7410*, 7411* Solis Mataojo, Maldonado, Uruguay; UFRGS 7412* Vila Serrana, Minas, Uruguay; UFRGS 7413* Canepas, Minas, Uruguay; ZVC-R 3798, 3835 Cerro de Montevideo, Montevideo, Uruguay; MNHN 1619; ZVC-R 308 San Gregorio, San José, Uruguay (Fig. 9).

Specimens indicated with an asterisk where included on genetic analysis.

Diagnosis: *Amphisbaena munoai* distinguishes from other species of *Amphisbaena* by the following combination of characters: (1) rounded head; (2) smooth segments on the tip of the tail; (3) four preloacal pores; (4) 202–218 body annuli; (5) row of postmalar shields present; (6) 18–25 caudal annuli; (7) caudal autotomy visible between 5 and 9 tail annuli; (8) 10–14 segments on the midbody annulus.

Comparison: *Amphisbaena munoai* is distinguished from *A. albocingulata* by presenting the post-malar row (vs. post-malar row absent). Differs from *A. hoguei* by presenting 202–218 body annuli (vs. 177–191 body annuli). It differs from *A. heterozonata* by presenting 18–23 caudal annuli (vs. 13–17 caudal annuli). It differs from *A. nigricauda* by presenting a uniform coloration in the tip of the tail (vs. a darker coloration in the tip of the tail). It differs from *A. trachura* by presenting smooth scales in the tip of the tail (vs.



Fig. 9. *Amphisbaena munoai*, ZVC-R 3840, Sierra de las Animas, Maldonado, Uruguay. Dorsal, lateral and ventral view of the head. Scale = 1 mm.

tuberculate scales). It differs from *A. darwini* by presenting a slender body and small SVL in adults, 102–151 mm (vs. sturdy body with long SVL in adults, 150–304 mm). Differs from *A. prunicolor* by presenting a uniform coloration pattern (vs. checkered coloration pattern). Differs from *A. tiaraju* sp. nov. by presenting a smaller distance between ocular shields, varying between vs. 28.7–37.5, $\bar{x} = 32.7 \pm 0.9$ of head length (HL) (vs. 35.3–42.7%, $\bar{x} = 39.5 \pm 2.3$) and 6.4% of 16S rDNA mean genetic distance. It differs from *A. arenicola* sp. nov. by presenting 3/3 supralabial shields (vs. 3/3 or 4/4 supralabial shields) and a larger nasal suture varying between 14.1 and 20.8, $\bar{x} = 17.6 \pm 1.5$ (vs. 12.5–17.2, $\bar{x} = 14.7 \pm 1.5$). Differs from *A. nana* sp. nov. by presenting a large frontal shield, with larger size

than parietal shield, varying between 25.9 and 35.8; $\bar{x} = 27.7 \pm 1.0$ of HL (vs. 18.7–28.7% $\bar{x} = 23.9 \pm 2.6$; with similar size than parietal shield).

Variation: A small species with snout-vent length (SVL) varying from 102 to 151 mm ($\bar{x} = 123.1 \text{ mm} \pm 12.1$) and tail length between 11.2 and 17.1 mm ($\bar{x} = 14.4 \pm 1.3$). Slender body with diameter 2.4–3.6% of SVL ($\bar{x} = 2.9 \pm 0.3$). Head longer than wide, with length 2.7–4% of SVL ($\bar{x} = 3.4 \pm 0.3$) and width 1.8–2.7% of SVL ($\bar{x} = 2.3 \pm 0.2$). Elongated snout varying from 44.9–54.3% of head length (HL) ($\bar{x} = 49.8 \pm 1.8$). Rostral shield triangular, barely visible dorsally, with height about 20.9–29.9% of HL ($\bar{x} = 24.0 \pm 1.9$). A pair of quadrangular nasal shields with lateral nostrils. Suture between nasals relatively long, varying from 14.1–20.9% of HL ($\bar{x} = 17.6 \pm 1.6$). A pair of enlarged prefrontal shields with length 32.2–44.1% of HL ($\bar{x} = 40.4 \pm 2.1$) and width 26.2–32.6% of HL ($\bar{x} = 29.1 \pm 1.6$). A pair of frontal shields smaller than prefrontals, varying from 21.5–35.8% of HL ($\bar{x} = 27.7 \pm 2.8$ CCB) and width 15.2–22.1% of HL ($\bar{x} = 17.8 \pm 1.5$). Ocular shield rhomboid, with length 20.9–32.9% of HL ($\bar{x} = 25.3 \pm 2.3$) and width 18.1–25.9% of HL ($\bar{x} = 22.3 \pm 1.5$). Enlarged postocular shield varying in length 20.9–41.9% of HL ($\bar{x} = 26.6 \pm 2.8$) and width 10.8–22.3% of HL ($\bar{x} = 18.3 \pm 2.2$ CCB). Relatively small rectangular temporal shield and a quadrangular and diminutive post-supralabial shield when present. Three supralabial shields with equivalent sizes. Three infra-labial shields: the first smaller and quadrangular; Second largest, being wider and deeper; and the third rectangular. Relatively small anterior mental shield, with length 17.6–24.4% of HL ($\bar{x} = 21.2 \pm 1.6$) and width 20.3–29.9% of HL ($\bar{x} = 24.5 \pm 1.8$). Posterior mental shield heptagonal, larger than anterior mental shield, with length 24.4–31.3% of HL ($\bar{x} = 28.1 \pm 1.8$) and width 20.1–31.1% of HL ($\bar{x} = 24.1 \pm 1.9$). Presence of one or two rows of postgenial shields with 2 + 3 segments. One pair of trapezoid malar shields, with length ranging from 18.4–26.4% of HL ($\bar{x} = 22.2 \pm 1.7$), and width 18.4–26.4% of HL ($\bar{x} = 8.7 \pm 2.1$). Row of postmalars present with 6–12 shields. Body annuli 202–218 ($\bar{x} = 210.1 \pm 3.7$). Caudal annuli 18–23 ($\bar{x} = 20.0 \pm 0.9$), caudal autotomy between 5 and 9 annulus ($\bar{x} = 8.3 \pm 0.7$); segments of the fourth caudal annulus 20–26 ($\bar{x} = 22.8 \pm 1.4$). Dorsal segments 10–14 ($\bar{x} = 12.6 \pm 0.9$) and ventral segments 13–18 ($\bar{x} = 16.1 \pm 1.0$) on the midbody annulus. Four precloacal pores arranged sequentially in the posterior portion of the segments of the last ventral annulus. Cloacal plate with 6–8 precloacal and 7–14 postcloacal shields. Specimens present light brown color pattern, more intense dorsally. On venter, the brown coloration extends laterally and fades in the centre.

Distribution: *Amphisbaena munoai* is restrictedly distributed in the Uruguayan Savannah areas of southern Brazil and Uruguay. It is widely distributed in Uruguay, from rock outcrops in eastern San Jose Department including Montevideo, Cerro Animas (type locality) to north in Cerro Largo Department. In Brazil, it is found only in Rio Grande do Sul state, Southern to the Camaquã River at the eastern portion of the Sul-riograndense Shield. The species is associated with rock outcrop habitats located in the southern areas of the Pelotas Batholith in the “Cinturão Dom Feliciano” geotectonic unit and other formations from the Rio de La Plata Craton (Fig. 6).

3.3.5. Comments on *Amphisbaena prunicolor* (Cope, 1885)

Aporarchus prunicolor Cope, 1885: 189. Type-locality: São João do Monte Negro, Rio Grande do Sul, Brazil.

Amphisbaena darwini– Boulenger, 1885: 297 (in part).

Amphisbaena prunicolor prunicolor– Gans, 1966: 246.

Amphisbaena prunicolor– Vanzolini, 2002: 358.

Amphisbaena prunicolor– Perez et al., 2012: 17.

Holotype: ANSP 12969 from São João do Monte Negro, currently Montenegro municipality, Rio Grande do Sul, collected by Herbert H. Smith.

Referred material: MZUSP 3507 Colatina, Espírito Santo, Brazil; MHNCI 8647 Boa Vista da Aparecida, Paraná, Brazil; MHNCI 8644 Capitão Leônidas Marques, Paraná, Brazil; MHNCI 10079 Coronel Vivida, Paraná, Brazil; MHNCI 8560, 8561, 8564; MCP 10903, 10904, 10905 Cruzeiro do Iguaçu, Paraná, Brazil; MHNCI 5944 Dois Vizinhos, Paraná, Brazil; MZUSP 87736, 87738, 87741 Foz do Chopim, Paraná, Brazil; MHNCI 10732 Laranjal, Paraná, Brazil; MHNCI 11912, 11913 Mangueirinha, Paraná, Brazil; MHNCI 10084 Mariópolis, Paraná, Brazil; UFRGS 5280, 5281 Nova Cantu, Paraná, Brazil; MHNCI 8648 Nova Prata do Iguaçu, Paraná, Brazil; MHNCI 8494 Quedas do Iguaçu, Paraná, Brazil; MHNCI 5163 Reserva do Iguaçu, Paraná, Brazil; UFRGS 5364* Bom Jesus, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 332, 333 Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 4357; MCP 12543 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 8910, 8911, 8912 Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 6379*, 6381*, 6382* Fagundes Varela, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 9005 Farrroupilha, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 4336 Frederico Westphalen; Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5723*, 5782*, 5784*, 5785* Guaporé, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 3616, 3617 Ijuí, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5322 Ivoti, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 4283, 4284 Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 6246* Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 6529, 6594 Montenegro, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5720*, 5721*, 5730* Nova Bassano, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 1980 Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 6445* Nova Prata, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 5929, 6095 Planalto, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 1943, 1944, 2322; MCN 2715, 2716, 2717, 2718, 3130, 3132, 3133, 3592, 4467; MCP 341, 342, 1551, 4316, 4783*, 4784, 4786, 4787, 4837, 4838, 4839, 5379, 5380, 5381, 5384, 5386, 5387*, 5434, 9778, 13800, 15071 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 8448 Riozinho, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 2649 Rolante, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 6482* Salvador do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 2777 São Sebastião do Caí, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 7644 Sapiranga, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 6125 Tenente Portela, Rio Grande do Sul, Brazil; MCP 1456 Três Passos, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 5317, 5318 Trindade do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil; MCN 15284, 15285 Triunfo, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS 2366 Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil; CHUFSC 731 Água Doce, Santa Catarina, Brazil; CHUFSC 750, UFRGS 4536 Anita Garibaldi, Santa Catarina, Brazil; MHNCI 2376 Caçador, Santa Catarina, Brazil; UFRGS 5269*, 5305* Campo Belo do Sul, Santa Catarina, Brazil; MCN 16337 Campos Novos, Santa Catarina, Brazil; UFRGS 4856* Capão Alto, Santa Catarina, Brazil; MHNCI 4076 Catanduvas, Santa Catarina, Brazil; MCP 2875 Concórdia, Santa Catarina, Brazil; MCP 3080, 3081 Itá, Santa Catarina, Brazil; MZUSP 12310 Nova Teutônia, Santa Catarina, Brazil; MCP 2905 Piratuba, Santa Catarina, Brazil; CHUFSC 604, 605, 606, 607, 608 São Domingos, Santa Catarina, Brazil; MZUSP 43026 São Miguel d'Oeste, Santa Catarina, Brazil; MHNCI 4090 Vargem Bonita, Santa Catarina, Brazil; CHUFSC 943, 944, 945 Xanxerê, Santa Catarina, Brazil; CHUFSC 1222 Xaxim, Santa Catarina, Brazil (see Fig. 10).

Specimens indicated with an asterisk where included on genetic analysis.

Diagnosis: *Amphisbaena prunicolor* is characterized by the following characters: (1) rounded head; (2) tail tip rounded, with smooth segments; (3) four precloacal pores; (4) dark brown, purplish coloration, with uniformly pigmented segments on dorsum and belly with checkered pattern.

Comparison: *Amphisbaena prunicolor* is distinguished from all species of the *A. darwini* complex, mainly by having a dorsal brown-purplish coloration and a ventral pale checkerboard pattern (vs. ventral uniformly colored). It also differs from *A. trachura* by presenting smooth segments the tail tip (vs. tuberculate segments on tail tip). Differs from *A. nigricauda* by presenting 181–215 body annuli (vs. 222–226 body annuli). It differs from *A. hogei* and *A.*



Fig. 10. *Amphisbaena prunicolor*, UFRGS 4536 from Anita Garibaldi, State of Santa Catarina, Brazil. Dorsal, lateral and ventral view of the head. Scale = 1 mm.

heterozonata by presenting a higher number of caudal annuli, 18–27 (vs. 15–19 and 13–17, respectively). Differs from *A. darwini* by its quadrangular parietal shields different from others body shields (vs. parietal region with variable shaped shields non-differentiable from body shields). It differs from *A. albocingulata* by presenting a post-malar row (vs. post-malar row absent). Differs from *A. munoai* by presenting an elongated body, 141–238 mm (SVL) with similar number of body annuli, 181–215 (vs. smaller body, 102–151 mm SVL, with similar number of body annuli 202–218 body annuli) and by 5% of 16S rDNA mean genetic distance. It differs from *A. arenicola* sp. nov. by presenting a longer snout, varying between 44 and 73.5% ($\bar{x} = 55.5 \pm 7.4\%$) of head length (HL) (vs. 42.6–47.9%, ($\bar{x} = 45.9 \pm 1.9\%$ of HL) and 4.5% of 16S

rDNA mean genetic distance. Differs from *Amphisbaena tyaraju* sp. nov. by presenting a lower distance between ocular shields, varying between 26.8% and 31.9% ($\bar{x} = 29.4 \pm 3.6$) of HL (vs. larger distance between ocular shields varying between 35.3% and 42.7%, $\bar{x} = 39.5 \pm 2.3$ of HL) and 5.1% of 16S rDNA mean genetic distance. It differs from *A. nana* sp. nov. by its similar-sized pre-frontal and frontal shields (vs. reduced frontal shields, smaller than pre-frontal shields) and 4.9% of 16S rDNA mean genetic distance.

Distribution: *Amphisbaena prunicolor* is distributed in Atlantic Forest remnants in Argentina (Corrientes and Misiones provinces), Paraguay (Itapúa department) and in northern Rio Grande do Sul, western Santa Catarina and Paraná, with historical records in the States of Rio de Janeiro, São Paulo and Espírito Santo, in Brazil.

For a recent and complete description of the morphology of *A. prunicolor* see Perez et al. (2012).

4. Discussion

Even with the recent advances in the knowledge of *Amphisbaena* including the description of 23 novel species in the last 20 years (Colli et al. 2016; Uetz & Hošek 2018), there are still many information gaps for most species. Fossorial squamates usually are not prioritized in samplings of amphibians and reptiles. Therefore, amphisbaenians remain as the group of Squamata less studied and poorly represented in biological collections (Gans 1967; Kearney 2003; Colli et al. 2016). Species boundaries have been hard to define among the *darwini*-Group mainly due to the lack of information regarding morphological variation and geographic distribution and still little is known about the barriers that can isolate amphisbaenians. Despite a rare record of water dispersion (Maschio et al. 2009) there is no concrete information about amphisbaenian dispersion ability. It has been suggested that fossorial habits would limit the ability to disperse across greater distances (Hembree 2006). Apparently, there is a correlation between the range of distribution and the snout-vent length of species, with larger species (~250 mm) occupying wider ranges (Colli et al. 2016). However, there is much uncertainty if some species have small ranges of distribution due to incomplete sampling or because it has a low vagility and a truly restricted distribution. In the other extreme, some widely distributed species may represent complex of cryptic or poorly studied species. In either case, it is clear that most *Amphisbaena* species are poorly sampled and even most of the collected material lacks a correct identification.

Fossoriality requires adaptations that might restrict colonization patterns and differentiation and population isolation processes (Albert et al. 2007). Due to the extreme underground habitat, amphisbaenians may exhibit morphological stability (Bickford et al. 2007), suggesting that speciation and molecular evolution may be uncoupled from morphological changes (Sampaio et al. 2014; Macey et al. 2004; Kearney & Stuart 2004). We would expect a gray zone in speciation that would not fit all criterions to delimit different species (De Queiroz 2007).

The *Amphisbaena*-species analyzed herein have a strong phylogenetic signal with a divergence into the mitochondrial lineages, corroborating other previous studies of *Amphisbaena* (e.g., Mulvaney et al. 2005; Albert et al. 2007; Albert & Fernandes 2009). As expected the reduction of gene flow due to limited dispersal ability would lead to a strong genetic structure (Poulson & White 1969; Albert et al., 2007). Herein, the genetic distances observed for the 16S rDNA gene (variation between 2.4% and 6.9%) were similar to those observed in the genus *Blanus* Wagler, 1830 (variation between 2.3% and 8.9%) (Sampaio et al. 2014). These values were also similar to those observed in other South American

reptiles and amphibians, which present distances ranging from 4% to 10% (Vences et al. 2010; Guarnizo et al. 2016; Gamble et al. 2012; Recoder et al. 2014; Werneck et al. 2015).

Despite their morphological similarity, some qualitative or quantitative characters allowed the interspecific distinction, such as coloration pattern, that at least distinguished *A. prunicolor* from other *Amphisbaena*. The smaller snout length observed in *A. arenicola* sp. nov. could be associate to the restinga areas with sandy soils that the specie inhabits. The closest similarities between *A. munoai* and *A. nana* sp. nov. are probably related to a similar habitat choice, rock outcrops, along the Uruguayan Savannas. Individuals of these species were not found in sympatry, however, besides the Camaquã River, we did not observe another barrier to delimit their geographical distributions.

Our results reinforce that integrative approaches are much necessary to describe the vastly underestimated diversity in *Amphisbaena* (Padial et al., 2009; Fouquet et al., 2007; Hung et al., 2004; Recoder et al., 2014). The description of three new species herein, endemic to southern Brazil, increases the known diversity to eight *Amphisbaena* distributed in the region (Lema 1994; Carreira et al. 2005; Perez et al. 2012).

Funding

This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) with the “Brazilian Program in Taxonomy - MCT/CNPq/MEC/CAPES/PROTAX (Edital nº 52/2010)” as part of the project “Taxonomia e Sistemática de Lagartos e Serpentes (Lepidosauria, Squamata) no Bioma Pampa no sul do Brasil e Uruguai” (Process 562355/2010-3 for M. Borges-Martins).

Acknowledgments

We would like to thank the collection curators for specimen's loan. We understand the difficulties for the maintenance of a collection and feel great dissatisfaction with the manner which Brazilian governments treat this subject. We feel that the loss of Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) and the imminent extinction of the Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoológica do Rio Grande do Sul (MCN/FZB) reflects the disregard for national culture and science. Without access to housed material, this and many other studies would not be conducted. We thank LR Malabarba, L Verrastro, PI Simões, RB Oliveira, N Fagundes and RW Ávila for suggestions and comments on an early version of this manuscript. We also thank A. Kupfer for his helpful comments and final revision. R. Perez thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the grant conceded.

References

- Albert, E.M., Fernández, A., 2009. Evidence of cryptic speciation in a fossorial reptile: description of a new species of *Blanus* (Squamata: Amphisbaenia: Blanidae) from the Iberian Peninsula. *Zootaxa* 2234, 56–68.
- Albert, E.M., Zardoya, R., García-París, M., 2007. Phylogeographical and speciation patterns in subterranean worm lizards of the genus *Blanus* (Amphisbaenia: Blanidae). *Mol. Ecol.* 16, 1519–1531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03248.x>.
- Almeira, J.P.F.Z., Freitas, M.A., Silva, M.B., Valverde, M.C.C., Rodrigues, M.T., Pires, A.M., Mott, T., 2018. A new four-pored *Amphisbaena* (Squamata: Amphisbaenidae) from northeastern Brazil. *Zootaxa* 4514, 553–562. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4514.4.8>.
- Balestrin, R.L., Cappellari, L.H., 2011. Reproduction and feeding ecology of *Amphisbaena munoai* and *Anops kingi* (Amphisbaenia, Amphisbaenidae) in the escudo sul-rio-grandense, southern Brazil. *Iheringia Ser. Zool.* 101, 93–102. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212011000100013>.
- Balbour, T., 1914. Some new reptiles. *Proc. N. Engl. ZoClub* 4, 95–98.

- Bell, T., 1833. Characters of two new genera of reptiles. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1833, 97–101.
- Berthold, A.A., 1859. Einige neue Reptilien des akademisch zoologischen Museums in Göttingen. *Nachr. Georg-August Univ. Königlichen Wiss. Gesellschaft (Göttingen)* 17, 179–181.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>.
- Boettger, O., 1885. Liste von Reptilien und Batrachiern aus Paraguay. *Z. Naturwissenschaft* 4 (58), 213–248.
- Boulenger, G.A., 1885. Remarks on a paper by Prof. E. D. Cope on the reptiles of the province Rio Grande do sul, Brazil. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 16, 294–298.
- Boulenger, G.A., 1890. Reptilia. In: Ridley, H.N. (Ed.), Notes on the Zoology of Fernando Noronha. *J. Linn Soc, London*, pp. 481–482.
- Boulenger, G.A., 1902. Descriptions of new fishes and reptiles discovered by Dr. F. Silvestri in South America. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 7 (1902), 284–288.
- Boulenger, G.A., 1907. Descriptions of new lizards in the British Museum. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 7 (19), 486–489.
- Boulenger, G.A., 1915. Descriptions of a new *Amphisbaena* and a new snake discovered by Dr. H.G.F. Spurrell in southern Colombia. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 659–661.
- Burmeister, C.H.C., 1861. Reise durch die La Plata-Staaten mit besonderer Rücksicht auf die physische Beschaffenheit und den Culturzustand der Argentinischen Republik. Ausgeführt in den Jahren 1857, 1858, 1859 und 1860. Halle H.W. Schmidt.
- Carreira, S., Meneghel, M., Achaval, F., 2005. Reptiles de Uruguay. DIRAC/Facultad de Ciencias, Montevideo.
- Castro-Mello, C., 2000. A new species of *Amphisbaena* from central Brazil (Squamata: Amphisbaenidae). *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* 41, 243–246.
- Castro-Mello, C., 2003. Nova espécie de *Bronia GRAY* 1845, do estado do Tocantins, Brasil (Squamata: Amphisbaenidae). *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* 43, 139–143.
- Colli, G.R., Zamboni, D.S., 1999. Ecology of the worm-lizard *Amphisbaena alba* in the cerrado of Central Brazil. *Copeia* 733–742.
- Colli, G.R., Fenker, F., Tedeschi, L.G., Barreto-Lima, A.F., Mott, T., Ribeiro, S.L.B., 2016. In the depths of obscurity: knowledge gaps and extinction risk of Brazilian worm lizards (Squamata, Amphisbaenidae). *Biol. Conserv.* 204, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.07.033>.
- Cope, E.D., 1861. Species of Reptilia Squamata. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 1861, 75–76.
- Cope, E.D., 1862. Catalogues of the reptiles obtained during the explorations of the Parana, Paraguay, Vermejo and Uruguay Rivers by Capt. Thos. J. Page, U.S.N., and of those procured by Lieut. N. Michler, U.S. top. Eng., commander of the expedition conducting the survey of the Atrato River. I. The Paraguay collection. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 14, 346–359.
- Cope, E.D., 1875. Checklist of North American Batrachia and Reptilia. *Bull. U. S. Natl. Mus.* 1, 1–104.
- Cope, E.D., 1885. Twelfth contribution to the herpetology of tropical America. *Proc. Am. Philos. Soc.* 22, 167–194.
- Costa, H.C., Bérnills, R.S., 2018. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécie. *Herpetol. Bras.* 8, 11–57.
- Costa, H.C., Resende, F.C., Teixeira Jr., M., Dal Vechio, F., Clemente, C.A., 2015. A new *Amphisbaena* (Squamata: Amphisbaenidae) from southern espinhaço range, southeastern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 891–901.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85, 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>.
- De Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard, D.J., Berlocher, S.H. (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 57–75p.
- De Queiroz, K., 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 56, 196–215.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>.
- Duméril, A.M.C., Bibron, G., 1839. *Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des reptiles*. Erratum. De l'ordre des Lézards ou des Sauriens. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris.
- Dunn, E.R., Piatt, J., 1936. A new *Amphisbaena* from Brazil. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 88, 527–528.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmill, N.J., 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS One* 2, 1109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001109>.
- Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., Werneck, F.P., Simons, A.M., 2012. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (Phyllopezus; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America open biomes. *Mol. Phylogenetics Evol.* 62, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.033>.
- Gans, C., 1962. Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 3. Redefinition and description of the Brazilian reptiles *Amphisbaena silvestrii* Boulenger and *A. neglecta* Dunn and Piatt. *Copeia* 164–170.
- Gans, C., 1963a. Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 7. Redescription and redefinition of *Amphisbaena mitchelli* Procter and *Amphisbaena slevini* Schmidt from the middle and lower Amazon, Brazil. *Am. Mus. Novit.* 2127, 1–22.
- Gans, C., 1963b. Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 8. A redescription of *Amphisbaena stejegeri* and the description of a new species of *Amphisbaena* from British Guiana. *Am. Mus. Novit.* 2128, 1–18.
- Gans, C., 1964a. Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 14. New records of *Amphisbaena silvestrii* Boulenger, and the description of a new two pored species from the northern Chaco. *Copeia* 553–561.
- Gans, C., 1964b. The South American species of *Amphisbaena* with a vertically keeled tail (Reptilia, Amphisbaenidae). *Senckenberg. Biol.* 45, 387–416.
- Gans, C., 1965. Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 16. On *Amphisbaena heathi* Schmidt and *A. carvalhoi* new species, small forms from the northeast of Brazil (Amphisbaenia: Reptilia). *Proc. Calif. Acad. Sci.* 4 (31), 613–630.
- Gans, C., 1966. Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia) 3. The small species from southern South America commonly identified as *Amphisbaena darwini*. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 134, 185–260.
- Gans, C., 1967. A check list of recent amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 135, 61–105.
- Gans, C., 1974. *Biomechanics: an Approach to Vertebrate Biology*. Lippincott Co, Philadelphia, PA.
- Gans, C., 1977. The biological roles of taxonomic characteristics utilized in amphisbaenian classification. *Br. J. Herpetol.* 5, 611–615.
- Gans, C., 1978. The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. *Trans. Zool. Soc. Lond.* 34, 347–416.
- Gans, C., 2005. Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 289, 1–130.
- Gans, C., Alexander, A.A., 1962. Studies on the amphisbaenids (Amphisbaenia; Reptilia). 2. On the amphisbaenids of the Antilles. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 128, 65–158.
- Gans, C., Diefenbach, C.O., 1972. Description and geographical variation of the South American *Amphisbaena angustifrons*: the southernmost amphisbaenian in the world (Reptilia, Amphisbaenia). *Am. Mus. Novit.* 2494, 1–20.
- Gans, C., Mathers, S., 1977. *Amphisbaena medemi*, an interesting new species from Colombia (Amphisbaenia, Reptilia) with a key to the Amphisbaenians of the Americas. *Fieldiana Zool.* 72, 21–46.
- Geurgas, S.R., Rodrigues, M.T., 2010. The hidden diversity of *Coleodactylus amazonicus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revealed by molecular data. *Mol. Phylogenetics Evol.* 54, 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.004>.
- Gomes, J., Maciel, A.O., 2012. A new species of *Amphisbaena* Linnaeus (Squamata, Amphisbaenidae) from the state of Maranhão, northern Brazilian cerrado. *Zootaxa* 3572, 43–54.
- Gray, J.E., 1865. A revision of the genera and species of amphisbaenians with the descriptions of some new species now in the collection of the British Museum. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 442–455.
- Gray, J.E., 1872. Catalogue of shield reptiles in the collection of the British Museum, part II. Emydosaurians, Rhynchocephalia, and amphisbaenians. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. London* 41.
- Guarnizo, C.E., Werneck, F.P., Giugliano, L.G., Santos, M.G., Fenker, J., Sousa, L., D'Angiolella, A.B., Santos, A.R., Strussmann, C., Rodrigues, M.T., Dorado-Rodrigues, T.F., Gamble, T., Colli, G.R., 2016. Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidae) of the Cerrado hotspot. *Mol. Phylogenetics Evol.* 94, 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.005>.
- Hembree, D.I., 2006. Amphisbaenian paleobiogeography: evidence of vicariance and dispersal patterns. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 235, 340–354.
- Hoogmoed, M.S., 1989. A new species of *Amphisbaena* (Amphisbaenia: Amphisbaenidae) from Suriname. Notes on the herpetofauna of Surinam XI in honour of Dr. Pieter Wagenaar Hummelinck. *Found. Sci. Res. Surinam Neth. Antilles Amsterdam* 123, 65–73.
- Hoogmoed, M.S., Avila-Pires, T.C.S., 1991. A new species of small *Amphisbaena* (Reptilia: Amphisbaenia: Amphisbaenidae) from western Amazonian, Brazil. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi Ser. Zool.* 7, 77–94.
- Hung, C.M., Hung, H.Y., Yeh, C.F., Fu, Y.O., Chen, D., Lei, F., Yao, C.T., Yao, C.J., Yang, X.J., Lai, Y.T., Li, S.H., 2014. Species delimitation in the Chinese bamboo partridge *Bambusicola thoracica* (Phasianidae; Aves). *Zool. Scr.* 43, 562–575. <https://doi.org/10.1111/zsc.12071>.
- Katoh, S., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Kearney, M., 2003. Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent fossil forms. *Herpetol. Monogr.* 17, 1–74.
- Kearney, M., Stuart, B.L., 2004. Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 1677–1683. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2771>.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Klappenbach, M.A., 1960. Notas herpetológicas. I. *Amphisbaena munoai* n. sp. (Amphisbaenidae). *Comun. Zool. Mus. Hist. Nat. Montev.* 4, 1–12.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Lancini, V., 1963. Una nueva especie del género *Amphisbaena* (Sauria: Amphisbaenidae) de Venezuela. *Publ. Ocas. Mus. Cienc. Nat. Caracas Zool.* 3.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic

- analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>.
- Lema, T., 1994. Lista comentada de répteis ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. *Com Mus Ciên Tecn PUCRS. Série Zool.* 7, 41–50.
- Linnaeus, C., 1758. *Systema naturae Per Regna Tria Naturae*. Editio Deciman, Reformata, Holmiae. Laurenti Salvii.
- Longrich, N.R., Vinther, J., Pyron, R.A., Pisani, D., Gauthier, J.A., 2015. Biogeography of worm lizards (Amphisbaenia) driven by end-Cretaceous mass extinction. *Proc. R. Soc. Lond.: Biol. Sci.* 282 <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3034>, 20143034.
- Macey, J.R., Papenfuss, T.J., Kuehla, J.V., Fourcadea, H.M., Boorea, J.L., 2004. Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Mol. Phylogenetics Evol.* 33, 22–31.
- Manly, B.F.J., 2000. *Multivariate Statistical Methods*, second ed. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, Florida, USA.
- Maschio, G.F., Prudente, A.L.C., Mott, T., 2009. Water dispersal of *Amphisbaena alba* and *Amphisbaena amazonica* (Squamata: Amphisbaenia: Amphisbaenidae) in Brazilian Amazonia. *Zoologia (Curitiba, Impr.)* 26, 1–4.
- Measey, G.J., 2006. Surveying biodiversity of soil herpetofauna: towards a standard quantitative methodology. *Eur. J. Soil Biol.* 42, 103–110. <http://doi:10.1016/j.ejsobi.2006.07.034>.
- Measey, G.J., Tolley, K.A., 2013. A molecular phylogeny for sub-Saharan amphisbaenians. *Afr. J. Herpetol.* 62, 100–108. <https://doi.org/10.1080/21564574.2013.824927>.
- Medrano, J.F., Aasen, E., Sharrow, L., 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8, 43.
- Mertens, R., 1929. *Herpetologische Mitteilungen: XXIII. Über einige Amphibien und Reptilien aus Süd-Bolivien*. *Zool. Anz. Leipzig* 86, 57–62.
- Montero, R., 2016. On the validity of several Argentinian species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). *J. Herpetol.* 50, 642–653. <https://doi.org/10.1670/15-048>.
- Montero, R., Céspedes, J., 2002. A new two pored Amphisbaena (Squamata: Amphisbaenidae) from Argentina. *Copeia* 792–797.
- Montero, R., Sáfadez, I.F., Álvarez, L.G., 1997. A new species of *Amphisbaena* from Bolivia. *J. Herpetol.* 31, 218–220.
- Mott, T., Vieites, D.R., 2009. Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Mol. Phylogenetics Evol.* 51, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.014>.
- Mott, T., Rodrigues, M.T., Freitas, M.A., Silva, T.F.S., 2008. New species of *Amphisbaena* with a nonautotomic and dorsally tuberculate blunt tail from state of Bahia, Brazil (Squamata, Amphisbaenidae). *J. Herpetol.* 42, 172–175.
- Mott, T., Rodrigues, M.T., Santos, E.M., 2009. A new *Amphisbaena* with chevron-shaped anterior body annuli from state of Pernambuco: Brazil (Squamata: Amphisbaenidae). *Zootaxa* 58, 52–58.
- Müller, L., 1924. Ueber neue oder seltene Mittelund südamerikanische Amphibien und Reptilien. *Mitt. Zool. Mus. Berl.* 11, 75–93.
- Mulvaney, A., Castoe, T.A., Ashton, K.G., Krysko, K.L., Parkinson, C.I., 2005. Evidence of population genetic structure within the Florida worm lizard, *Rhineura floridana* (Amphisbaenia: Rhineuridae). *J. Herpetol.* 39, 118–124.
- Noble, G.K., 1921. Two new lizards from northwestern Peru. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 29, 141–143.
- Noonan, B.P., Chippindale, P.T., 2006. Dispersal and vicariance: the complex evolutionary history of boid snakes. *Mol. Phylogenetics Evol.* 40, 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.010>.
- Oliveira, E.C.S., Vaz-Silva, W., Santos Jr., A.P., Graboski, R., Teixeira Jr., M.J.R., Dal-Vechio, F., Ribeiro, S., 2018. A new four-pored *Amphisbaena* Linnaeus, 1758 (Amphisbaenia, Amphisbaenidae) from Brazilian Amazon. *Zootaxa* 4420, 451–474. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4420.4.1>.
- Padial, J.M., Castroviejo-Fisher, S., Köhler, J., Vilà, C., Chaparro, J.C., De la Riva, I., 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zool. Scr.* 38, 431–447. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2008.00381.x>.
- Padial, J.M., Miralles, A., Dela Riva, I., Vences, M., 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* 7, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 205–247.
- Peracca, M.G., 1897. *Rettili e Anfibi. Viaggio del Dott. Alfredo Borelli nel Chaco boliviano e nella Repubblica Argentina*. *Boll. dei Musei Zool. Anat. Comp. Univ. Torino* 12, 1–19.
- Perez, R., Ribeiro, S., Borges-Martins, M., 2012. Reappraisal of the taxonomic status of *Amphisbaena prunicolor* (Cope 1885) and *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). *Zootaxa* 3550, 1–25.
- Peters, W.C.H., 1878. Über vier neue amerikanische Amphisbaena-Arten. *Monatsberichte der Königlichen Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin* 1878, 778–781.
- Pinna, P.H., Mendonça, A.F., Bocchiglieri, A., Fernandes, D.S., 2010. A new two-pored *Amphisbaena* Linnaeus from the endangered Brazilian Cerrado biome (Squamata: Amphisbaenidae). *Zootaxa* 2569, 44–54.
- Pinna, P.H., Mendonça, A.F., Bocchiglieri, A., Fernandes, D.S., 2014. A new species of *Amphisbaena* Linnaeus, 1758 from a cerrado region in Bahia, northeastern Brazil (Squamata: Amphisbaenidae). *Herpetologica* 70, 339–349. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-13-00039>.
- Pook, C.E., Wüster, W., Thorpe, R.S., 2000. Historical biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: viperidae: crotalidae: crotalusviridis), inferred from mitochondrial DNA sequence information. *Mol. Phylogenetics Evol.* 15, 269–282. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0756>.
- Poulson, T.L., White, W.B., 1969. The cave environment. *Science* 165, 971–981.
- Procter, J.B., 1923. On new and rare reptiles from South America. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1061–1068.
- Recoder, R.S., Werneck, F.P., Teixeira, M., Colli, G.R., Sites, J.W., Rodrigues, M.T., 2014. Geographic variation and systematic review of the lizard genus *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae), with the description of a new species. *Zool. J. Linn. Soc.* 171, 206–225. <http://doi:10.1111/zoj.12128>.
- Ribeiro, S., Castro-Mello, C., Nogueira, C., 2009. New species of *Anops* Bell, 1833 (Squamata, Amphisbaenia) from jalapão region in the Brazilian cerrado. *J. Herpetol.* 43, 21–28.
- Ribeiro, S., Gomes, J.O., Silva, H.L.R., Cintra, C.E.D., Silva-Junior, N.J., 2016. A new two-pored species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae) from the Brazilian Cerrado, with a key to the two-pored species of Amphisbaena. *Zootaxa* 4147, 124–142. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4147.2.2>.
- Ribeiro, L.B., Gomides, S.C., Costa, H.C., 2018. A new species of *Amphisbaena* from northeastern Brazil (Squamata: Amphisbaenidae). *J. Herpetol.* 52, 234–241. <https://doi.org/10.1670/17-028>.
- Roberto, I.J., Brito, L.B.M., Ávila, R.W., 2014. A new six-pored *Amphisbaena* (Squamata: Amphisbaenidae) from the coastal zone of northeast Brazil. *Zootaxa* 3753, 167–176. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3753.2.6>.
- Rodrigues, M.T., 2003. *Herpetofauna of Quaternary sand dunes of the middle Rio São Francisco, Bahia, Brazil. VIII. Amphisbaena arda* sp. nov., a fuliginosa-like checkered patterned *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). *Phyllomedusa* 1, 51–56.
- Rodrigues, M.T., Andrade, G.V., Lima, D.J., 2003. A new species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae) from state of Maranhão, Brazil. *Phyllomedusa* 2, 21–26.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Sampaio, F.L., Harris, D.J., Perera, A., Salvi, D., 2014. Phylogenetic and diversity patterns of *Blanus* worm lizards (Squamata: Amphisbaenia): insights from mitochondrial and nuclear gene genealogies and species tree. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 53, 45–54. <https://doi.org/10.1111/jzs.12075>.
- Schmidt, K.P., 1936. Notes on brasilian amphisbaenians. *Herpetologica* 1, 28–32.
- Shine, R., 1988. Food habits and reproductive biology of small Australian snakes of the genera *Uroechis* and *Suta* (Serpentes, Elapidae). *J. Herpetol.* 22, 307–315.
- StatSoft Inc., 2011. *Electronic Statistics Textbook*. StatSoft, Tulsa, OK. Available from: www.statsoft.com/textbook.
- Stejneger, L., 1911. Description of a new amphisbaenoid lizard from Peru. *Proc. U. S. Natl. Mus.* 41, 283–284.
- Stimson, A.F., 1972. A new species of *Anops* from Mato grosso, Brazil (Reptilia: Amphisbaenia). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool)* 24, 205–212.
- Strauch, A., 1881. *Bemerkungen über die Eidechsenfamilie der Amphisbaeniden. Mélanges Biologiques de l'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg* 11, 355–479.
- Strussman, C., Carvalho, M.A., 2001. Two new species of *cercolophia vanzolini*, 1992 from the state of Mato grosso, western Brazil (Reptilia, Amphisbaenia, Amphisbaenidae). *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino* 18, 487–505.
- Strussmann, C., Mott, T., 2009. Sympatric amphisbaenids from Manso Dam region, Mato grosso state, western Brazil, with the description of a new two-pored species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 44, 37–46. <https://doi.org/10.1080/01650520802628295>.
- SystatSoftware Inc., 2006. *SigmaPlot for Windows, Version 10.0*. San Jose, CA. Available from: www.sigmaplot.com.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Teixeira Jr., M., Dal-Vechio, F., Neto, A.M., Rodrigues, M.T., 2014. A new two-pored *Amphisbaena* Linnaeus, 1758, from western Amazonia, Brazil (Amphisbaenia: Reptilia). *South Am. J. Herpetol.* 9, 62–74. <http://doi:10.2994/SAJH-D-14-00004.1>.
- Templeton, A.R., 1981. Mechanisms of speciation – a population genetic approach. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 12, 23–48.
- Uetz, P., Hosek, J. (Eds.), 2018. *The Reptile Database*. <http://www.reptile-database.org>.
- Vanzolini, P.E., 1950. Contribuições ao conhecimento dos lagartos brasileiros da família Amphisbaenidae Gray, 1825. I. Sobre uma nova subespecie insular de *Amphisbaena darwini* D. and B., 1839. *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* 9, 69–77.
- Vanzolini, P.E., 1951. *Amphisbaena fuliginosa*. Contribution to the knowledge of the Brazilian lizards of the family Amphisbaenidae Gray, 1825. 6. On the geographical distribution and differentiation of *Amphisbaena fuliginosa* Linné. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 106, 1–67.
- Vanzolini, P.E., 1964. *Amphisbaena bahiana* sp. n., do Brasil (sauria: Amphisbaenidae). *Pilot Reg. Zool.* 8, 1.
- Vanzolini, P.E., 1971. New Amphisbaenidae from Brasil. *Pap. Avulsos Zool. (Sao Paulo)* 24, 191–195.
- Vanzolini, P.E., 1991a. Two new small species of *Amphisbaena* from the fossil dune field of the middle Rio São Francisco, state of Bahia, Brasil (Reptilia, Amphisbaenia). *Pap. Avulsos Zool.* 37, 259–276.
- Vanzolini, P.E., 1991b. Two further new species of *Amphisbaena* from the semi-arid northeast of Brasil (Reptilia, Amphisbaenia). *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* 37, 347–361.

- Vanzolini, P.E., 1991c. A third species of *Bronia* gray, 1865 (Reptilia, Amphisbaenia). Pap. Avulsos Zool. 37, 379–388.
- Vanzolini, P.E., 1994. New species of *Amphisbaena* from state of sao Paulo, Brasil. Pap. Avulsos de Zool. São Paulo 39, 29–32.
- Vanzolini, P.E., 1995. A new species of *Amphisbaena* from the state of Mato grosso, Brasil (Reptilia: Amphisbaenia: Amphisbaenidae). Pap. Avulsos de Zool. São Paulo 39, 217–221.
- Vanzolini, P.E., 1996. On slender species of *Amphisbaena*, with the description of a new one from northeastern Brasil (Reptilia, Amphisbaenia). Pap. Avulsos de Zool. São Paulo 39, 293–305.
- Vanzolini, P.E., 1997. The *silvestrii* species group of *Amphisbaena*, with the description of two new Brazilian species (Reptilia: Amphisbaenia). Pap. Avulsos Zool. (São Paulo) 40, 65–85.
- Vanzolini, P.E., 2002. An aid to the identification of the South American species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). Pap. Avulsos Zool. (Sao Paulo) 42, 351–362.
- Vences, M., Glaw, F., Köhler, J., Wollenberg, K.C., 2010. Molecular phylogeny, morphology and bioacoustics reveal five additional species of arboreal microhylids of the genus *Anodonthyla* from Madagascar. Contrib. Zool. 79, 1–32.
- Wagler, J.G., 1824. Serpentes Brasiliensium Species Novae ou Histoire Naturelle des Espèces Nouvelles de Serpens. Munich (Monachii), France Seraph. Hiibschmann.
- Wagler, J.G., 1830. Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugthiere und Vögel. J.G. Cotta, Munich, pp. 196–197.
- Werneck, F.P., Leite, R.N., Geurgas, S.R., Rodrigues, M.T., 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. BMC Evol. Biol. 15, 94. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0368-3>.
- Werner, F., 1901. Reptilien und Batrachier aus Peru und Bolivien. Abh. Ber. Zool. Anthropol. Mus. Dresd. 9, 1–14.
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical Analysis, fifth ed. Prentice Hall Inc, New Jersey.

Capítulo II

Revisão taxonômica das cobras-cegas associadas à *Amphisbaena darwinii* Duméril & Bibron
1839 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae)

(Manuscrito a ser submetido à *Zoologica Scripta*)

Revisão taxonômica das cobras-cegas associadas à *Amphisbaena darwini* Duméril & Bibron 1839 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae)

Renata Perez ^{1*}, Márcio Borges-Martins ¹

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal e Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, prédio 43435, sala 102, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: renattaperez@gmail.com

Título curto: Reavaliação taxonômica das espécies associadas à *Amphisbaena darwini*

Manuscrito a ser submetido a *Zoologica Scripta*

Resumo

Revisamos o status taxonômico de *Amphisbaena darwini*, *A. heterozonata* e *A. trachura*, táxons tradicionalmente considerados subespécies de *A. darwini*. Apesar de autores elevarem esses táxons a nível específico, as decisões taxonômicas foram feitas sem comentários. Os limites entre esses táxons permaneceram incertos e identificações equivocadas continuam ocorrendo ao longo da distribuição das espécies. Para reavaliarmos esse complexo de espécies, aplicamos a abordagem da taxonomia integrativa, através do uso de análises filogenéticas (genes mitocondriais e nucleares), morfológicas (caracteres quantitativos e qualitativos) e limites geográficos. Nossos resultados identificaram a presença de um novo táxon, *Amphisbaena grupoE* sp. nov., identificado principalmente pelo padrão de coloração com anéis escuros e claros ao longo do corpo. Além disso, observamos a presença de pelo menos duas linhagens dentro de *Amphisbaena darwini*, uma ao sul do Rio Grande do Sul e outra no Uruguai. *Amphisbaena trachura* e *A. heterozonata* são redescritas no presente trabalho. Esses resultados aumentam para nove as espécies conhecidas de *Amphisbaena* para a região sul do Brasil, Uruguai e Argentina.

Palavras chave: Cobra-cega, América do Sul, Taxonomia, Genética, Morfologia.

Introdução

O Brasil possui a maior diversidade de espécies de Amphisbaenidae Gray 1865 da América do Sul, com três gêneros e 73 espécies reconhecidas (Perez et al 2012; Costa & Bérnils 2015), algumas descritas recentemente (ver Pinna et al 2010; Gomes & Maciel 2012; Pinna et al 2014; Roberto et al 2014; Teixeira et al 2014). Mesmo com uma melhor descrição da diversidade atual do grupo no país, há uma necessidade clara de revisões taxonômicas e de descrições morfológicas detalhadas que auxiliem nas identificações dos táxons e seus limites (Vanzolini 2002; Ribeiro et al 2009; Perez et al 2012; Pinna et al 2010). São ainda comuns identificações equivocadas em coleções científica, em parte pela má delimitação de muitos táxons ao longo de suas distribuições geográficas.

Até a década de 1960, não existiam trabalhos de revisão taxonômica que incluíssem anfisbenas Sul-Americanas. Alguns grupos de espécies foram propostos, tendo por base similaridades morfológicas (ver Gans 1962, 1963, 1964, 1965 e 1966). Apesar de várias espécies já estarem formalmente descritas na época, a maioria dos exemplares da região sul da América do Sul, depositados em coleções científicas, eram identificados como *Amphisbaena darwini* Duméril & Bribon 1839. Gans (1966) realizou uma extensa revisão e identificou uma complexa diversidade de formas amplamente distribuídas nas regiões sudeste e sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Além disso, reconheceu *Amphisbaena heterozonata* Burmeister 1861 e *Amphisbaena trachura* Cope 1885 como subespécies de *A. darwini*, indicando uma ampla zona com a existência de indivíduos com caracteres intermediários no extremo sul do Brasil (Rio Grande do Sul), norte do Uruguai e leste da Argentina (Gans 1966).

A determinação das subespécies identificadas por Gans (1966) se manteve até os anos 2000 (ver Achaval 1987; Lema 1994; Achaval 1997), quando Vanzolini (2002) elevou os três táxons ao nível de espécies (decisão aplicada a todos os táxons subespecíficos de *Amphisbaena*). Os caracteres utilizados (número de anéis do corpo, cauda e segmentos dorsais e ventrais) apresentavam alto grau de sobreposição, o que dificultou a diferenciação entre esses táxons. Portanto, na prática, a identificação das três espécies permaneceu baseada nas diagnoses (subespecíficas) de Gans (1966).

Amphisbaena heterozonata é amplamente distribuída na região norte da Argentina e mesmo enquanto subespécie não teve problemas em sua identificação no país (Montero 1994, 1996; Avila et al 2000, 2013). Na suposta zona de ocorrência de intermediários entre *A. heterozonata* e *A. trachura* (Gans 1966) somente espécimes de *A. trachura* foram

recentemente identificados (Perez et al 2012). Sendo assim, *Amphisbaena trachura*, com indivíduos identificados principalmente pela tuberculação caudal (caractere indicado em Gans, 1966), é distribuída de São Paulo ao Rio Grande do Sul, Brasil e leste da Argentina. Por sua vez, *Amphisbaena darwinii* possui registros confirmados para o Uruguai. No entanto, a zona de intermediários entre *Amphisbaena darwinii* e *A. trachura* sugerida por Gans (1966), causou diversos problemas nas identificações e delimitações dos limites entre os táxons ao longo dos anos. Lema (1994) registrou as duas subespécies para o Rio Grande do Sul. Já no Uruguai, Achaval (1997) registrou somente *A. darwinii darwinii*, mesmo comentando sobre indivíduos com características de *A. darwinii trachura* na suposta zona de intermediários. Carreira et al (2005) reforçaram a presença de formas intermediárias entre as subespécies, porém mantiveram a determinação prévia de Achaval (1997), considerando somente *A. darwinii darwinii* no Uruguai. No Brasil, os registros de *Amphisbaena darwinii* só foram confirmados por Perez et al (2012) que indicaram variação entre os indivíduos do Uruguai e leste do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Atualmente, os limites entre esses táxons permanecem incertos, e identificações equivocadas continuam ocorrendo ao longo da distribuição das espécies. Com o aumento das coletas e análise da variação morfológica de outras espécies, também associadas à *Amphisbaena darwinii*, percebeu-se necessária uma revisão taxonômicas deste complexo de espécies (Perez et al. 2012).

A inclusão de diferentes linhas de evidências, como sugere a taxonomia integrativa (Dayrat 2005), vem auxiliando na delimitação de espécies como hipóteses (Padial et al 2009, 2010). Considerando que espécies são linhagens de populações evoluindo independentemente (De Queiroz 1998, 2005, 2007), mas que não necessariamente necessitam de caracteres morfológicos para delimitá-las (Camargo & Sites 2013), a congruência entre diferentes linhas de evidências é desejável e aumenta o suporte da hipótese de espécies (Dayrat 2005, Padial et al 2010). Um número crescente de estudos com marcadores moleculares vêm identificando complexos de espécies em táxons definidos por morfologia e que vinham sendo considerados como uma única espécie amplamente distribuída (Fouquet et al., 2007; Funk & Omland, 2003; Geurgas & Rodrigues, 2010; Hebert et al., 2004; Oliver et al., 2009; Pfenninger & Schwenk, 2007, Werneck et al 2015, Gamble et al 2012). Análises detalhadas da morfologia desses complexos de espécies também são fundamentais, pois muitas vezes têm revelado diferenças antes desconhecidas (Recoder et al 2014; Perez & Borges-Martins – Capítulo I).

Visando melhor delimitar as unidades taxonômicas associadas à *Amphisbaena darwinii*, realizamos uma extensa revisão do grupo, analisando de forma integrada a variação

de caracteres morfológicos e moleculares ao longo da ampla distribuição geográfica do complexo.

Material e Métodos

Molecular: Para a análise molecular, incluímos 44 espécimes de *Amphisbaena* Linnaeus 1758 (Apêndice I). A amostragem incluiu indivíduos da Argentina (N=2), Uruguai (N=3) e Brasil, principalmente do estado do Rio Grande do Sul (N=17), selecionados pela disponibilidade, buscando abranger diferentes localidades dentro da distribuição conhecida das espécies em estudo (ver Gans 1966). A seleção do grupo externo foi baseada na filogenia de Mott & Vieites (2009) que obtêm *Amphisbaena trachura* e *A. munoai* como espécies irmãs e *A. kingii* (Bell 1833) (N=2) como uma das espécies próximas a elas. Além destes táxons incluímos todas as espécies recentemente descritas [*Amphisbaena* grupo1 (N=4), *Amphisbaena* grupo2 (N=1) e *Amphisbaena* grupo3 (N=2) (Perez & Borges-Martins – Capítulo I)] e identificadas como próximas à *Amphisbaena munoai* Klappenbach 1960 (N=5) e *Amphisbaena prunicolor* (Cope 1885) (N=7). Incluímos também, *Leposternon microcephalum* Wagler 1824 (N=1) como representante mais distante visando o enraizamento dos cladogramas (ver Mott & Vieites 2009).

O DNA foi extraído de tecidos (fígado) de amostras previamente preservadas em etanol 99%, utilizando o método de Medrano et al (1990), com modificações. Obtivemos sequências parciais de genes mitocondriais RNA 16S ribossomal (16S), citocromo b (CYTB), e NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) e do gene nuclear neurotrofina-3 (NT3), através de reações de cadeia de polimerase (PCR) com primers descritos na literatura (Palumbi 1996 – 16S; Pook et al. 2000 – CYTB; Macey et al 2004 – ND2; Noonan & Chippindale 2006 – NT3).

As amplificações foram realizadas em reações com 20µl de volume contendo 10–50ng de DNA, 1X Buffer, 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase, além de 1 µl de Triton 4%. Para os genes 16S e ND2 foram incluídos uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 54°C por 45s, e extensão a 72° C por 1min e 30s. Para o gene cytb, incluímos uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 4 min, e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60s, anelamento a 58°C por 60s, e extensão a 72°C por 2min. Para o gene nuclear NT3, incluímos uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 2min, e 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 49°C por 45s, e extensão a 72°C por 1min e 30s. Os produtos de

PCR foram purificados utilizando ExoSAP (exonuclease I e shrimp alkaline phosphatase) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen, Seul, Coréia do Sul.

O software Geneious 6.1.6 (Kearse et al., 2012), foi utilizado para visualização e alinhamento de sequências e como plataforma para exportação em diferentes formatos. As sequências foram alinhadas para cada gene independentemente utilizando Mafft Multiple Alignment plugin (Kato 2013), seguindo o algoritmo G-INS-i com definições padrão (abertura de gap = 1.53, extensão de gap = 0.123). Distâncias genéticas médias entre os grupos pré-determinados foram realizadas através do software Mega 6 (Tamura et al. 2013) com modelo de substituição de Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993) e 1000 réplicas de *bootstrap*. Para os cálculos de distância genética, foram utilizados somente o conjunto de genes mitocondriais com dados faltantes retirados. Para selecionar o modelo nucleotídeo mais apropriado para as análises subsequentes foi utilizado o software Partition Finder v1.1.0 (Lanfear et al 2012).

As árvores filogenéticas foram construídas através de Máxima Parcimônia (MP), utilizando o software TNT v.1.1 (Goloboff et al 2008), pelo método ‘Traditional Search’ com 1 random seed e 10000 réplicas para encontrar a árvore de menor tamanho. E através de Inferência Bayesiana (BI), realizada utilizando o software MrBayes 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) com 400 milhões de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), amostradas a cada 1000 passos e os primeiros 10% dos passos foram descartados como *burn-in*.

Morfologia: Foram analisados 194 espécimes de *Amphisbaena* (Apêndice I) que se enquadraram nas identificações prévias ou variação observada em *Amphisbaena darwini*, *A. heterozonata* e *A. trachura* (Gans 1966, Perez et al 2012), além de exemplares recentemente coletados e morfologicamente similares a estas espécie. A amostragem incluiu indivíduos da Argentina (N=43), Uruguai (N=56) e Brasil, estados do Paraná (N=24), Santa Catarina (N=8) e Rio Grande do Sul (N=63), buscando ampliar a variação morfológica e distribuição geográfica das espécies em estudo. A inclusão de uma maior número de espécimes permitiu uma melhor avaliação da variação morfológica e a inclusão de localidades onde o material genético não era disponível. Os espécimes analisados estão depositados nas seguintes coleções científicas: Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Santa Catarina (CHUFSC), Florianópolis, Brasil; Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil; Museo Argentino de Ciencias Naturales ‘Bernardino Rivadavia’ (MACN), Buenos Aires, Argentina; Museo Nacional de Historia Natural, Montevideú, Uruguai (MNHN); Museu de Ciências Naturais da Fundação

Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCN), Porto Alegre, Brasil; Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Porto Alegre, Brasil; Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI), Curitiba, Brasil e Sección de Zoología Vertebrados Facultad de Ciencias UDELAR (ZVCR), Montevideu, Uruguai.

O lectótipo de *Amphisbaena darwinii* (MNHN 3112) e o holótipo de *A. trachura* (ANSP 12988) foram analisados através de fotografias enviadas pelos curadores das coleções em que estão depositados: Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, França e Academy of Natural Science, Filadélfia, Estados Unidos. O holótipo de *Amphisbaena heterozonata*, originalmente depositado na coleção da Halle University, Alemanha, foi perdido (Gans 1966) e, portanto não foi analisado.

A terminologia da escutelação cefálica seguiu Gans & Alexander (1962) e Gans (1987). O arranjo de escamas, contagens e medidas seguem descrição feita em Perez et al (2012). As medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital com 0,01mm de precisão, exceto o comprimento rostro-cloacal (CRC) medido com auxílio de uma régua milimetrada.

Como *Amphisbaena* representa atualmente uma grande diversidade morfológica devido a sinonimização recente (ver Mott & Vieites 2009; Costa & Bérnils 2015), para fins de diagnose, consideramos que as espécies com cabeça arredonda são aquelas formalmente incluídas nos gêneros *Amphisbaena*, *Bronia* Gray 1865 e *Cercolophia* Vanzolini 1992, que apresentam o focinho redondo, conforme indicado em Kearney (2003). O formato distal da cauda, nas espécies em estudo, se refere a espécies com cauda cilíndrica, representada formalmente pelos gêneros *Anops*, *Amphisbaena* e *Bronia*, que podem possuir diferenças quanto a superfície distal dos segmentos (lisos ou tuberculados) (ver Kearney 2003).

Para testar a congruência entre os resultados, os grupos utilizados foram baseados nos cladogramas obtidos através da análise molecular que apresentavam algum grau de agrupamento geográfico em conjunto com as variações discretas observadas nos caracteres qualitativos (padrão de coloração e formato da cauda). Foi realizada uma análise descritiva para sumarizar a variação dos caracteres entre os táxons (médias, medianas, intervalos e desvios padrão). Suposições de normalidade e homocedasticidade foram testadas usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente (Zar 2010). Através do Software Sigma Plot (SystatSoftware, Inc. 2006), testes de Anova ou Kruskal-Wallis foram realizados para verificar a existência de diferenças significativas entre os caracteres nos grupos.

Realizamos análises de Função Discriminante exploratórias para acessar o grau de distinção entre grupos e identificar possíveis caracteres diagnósticos (Manly 2000; StatSoft

2011), através do software Statistica 12 (StatSoft 2014). As análises foram realizadas separadamente para dados merísticos e morfométricos. Para as análises morfométricas, utilizamos as razões entre os caracteres morfométricos e o comprimento da cabeça (CCB) ou comprimento rostro-cloacal (CRC).

Resultados

Molecular: Dos 44 exemplares analisados obtivemos um alinhamento total de 2018 pares de bases para os quatro genes. Dos dados mitocondriais obtivemos 1604 pares de base, sendo: 16S – 475pb com 53 sítios polimórficos e 35 sítios parcimônia informativos; cytb – 660pb com 252 sítios polimórficos e 178 sítios parcimônia informativos; e ND2 – 467pb com 210 sítios polimórficos e 157 sítios parcimônia informativos. Do alinhamento do gene nuclear NT3, obtivemos 415pb com 18 sítios polimórficos e oito sítios parcimônia informativos. Os modelos GTR+G (16S, cytb – primeira e terceira posição, e ND2 – primeira e terceira posição), GTR+I+G (cytb – segunda posição, e ND2 – segunda posição) e HKY+I (NT3) foram os mais apropriados e utilizados nas análises subsequentes.

Morfologia: Observamos diferenças morfológicas em caracteres qualitativos, como o padrão de coloração e o formato da escamas da cauda, além de caracteres merísticos e morfométricos da escutelação cefálica. Sobre a coloração observamos três padrões de pigmentação das escamas corporais distintos (Figura 3). Padrão uniforme (Figura 3A), com espécimes apresentando escamas corporais uniformemente pigmentadas no dorso e laterais do ventre, observado nos Grupos A, B e D. Padrão central (Figura 3B), com espécimes que apresentam pigmentação intensa na região central de cada escama do corpo, formando pontos escuros no centro de cada escama no dorso e nas laterais do ventre, observado no Grupo C. E padrão anterior (Figura 3C), com espécimes apresentando escamas pigmentados mais intensamente na região anterior, formando um padrão alternado de anéis transversais escuros e claros, observado no Grupo E.

Nas análises quantitativas, para os cinco grupos, todos os caracteres merísticos variaram significativamente (Kruskal-Wallis ou Anova, $P < 0.01$, Tabela 3). Na análise discriminante exploratória para esses caracteres observamos o distanciamento dos espécimes do Grupo C e E dos demais (Figura 5A). A primeira função discriminante representou 82,9% da variação da amostra e foi correlacionada com o número de anéis caudais (ACA), diferenciando o Grupo C dos demais (Figura 6, Material suplementar 1). Já a segunda função

discriminante, representou 12,8% da variação da amostra e foi correlacionada com a posição do anel de autotomia caudal (AUTO), distinguindo o Grupo E dos demais (Figura 6, Material suplementar 1). Reanalizando com a inclusão do Grupo X, observamos a sobreposição destes indivíduos com os Grupos A, B e D, não sendo possível sua distinção (Figura 5B). Através da matriz de classificação desta análise, obtivemos 26,3% destes indivíduos identificados como pertencentes ao Grupo B e 42,1% ao Grupo D, o restante artificialmente identificado como Grupo X.

Em relação aos caracteres morfométricos, para os cinco grupos, a maioria apresentou diferenças significativas (Kruskal-Wallis ou Anova, $P < 0.01$, Tabela 3). Na análise discriminante exploratória, a primeira função discriminante representou 59,9% da variação da amostra e foi correlacionada com o comprimento da cauda (CCA), distinguindo o Grupo C dos demais (Figura 5C, Material suplementar 2). A segunda função discriminante representou 21,9% da variação da amostra e foi correlacionada negativamente com o comprimento mandibular (CMD) e com a largura anterior da cabeça (LACB), distinguindo o Grupo E dos Grupos A e D (Figura 5C, Material suplementar 2). Reanalizando com a inclusão do Grupo X, assim como para os caracteres merísticos, observamos a sobreposição destes indivíduos com os Grupos A e D (Figura 5D). Através da matriz de classificação desta análise, obtivemos 26,7% destes indivíduos identificados como pertencentes ao Grupo D, 6,7% pertencentes ao Grupo A e 6,7% ao Grupo B, o restante artificialmente identificado como Grupo X.

Com os resultados obtidos e através de interpretações da taxonomia integrativa (Dayrat 2005; Padial et al 2010), consideramos os cinco Grupos analisados como três espécies distintas (Grupos B, C e E) e um complexo com pelo menos duas espécies candidatas não confirmadas (Grupos A e D). Nos Grupos C e E todas as evidências analisadas são congruentes reforçando sua distinção como espécies plenas. O Grupo B, mesmo apresentando pouca divergência genética em relação ao Grupo A nos genes 16S e CYTB, apresenta caracteres morfológicos qualitativos únicos que também permitem sua distinção como espécie plena. Os Grupos A e D, mesmo apresentando divergência genética para pelo menos dois genes (16S: 3,4% e ND2:11,2%), não apresentam caracteres morfológico qualitativo discreto que indique sua diferenciação, mesmo que não representem grupos idênticos como indicado a análise discriminante exploratória. A existência de um grande número de indivíduos não identificados (Grupo X) e com caracteres associados a ambos Grupos A e D reforçou a decisão de mantê-los como um complexo de espécies, com pelo menos duas espécies candidatas não confirmadas.

Considerações taxonômicas

Para as considerações taxonômicas e correta associação aos nomes disponíveis foram realizadas comparações com os holótipos, descrições originais ou redescrições disponíveis para todas as espécies de *Amphisbaena* reconhecidas. Essa extensa comparação se deve à falta de diagnoses disponível e a grande diversidade morfológica que o gênero apresenta atualmente.

Conclusões

A morfologia conservada em diversas espécies de *Amphisbaena* (Gans 1978), aliada às mudanças taxonômicas propostas por Vanzolini (2002) e aos erros de identificação ao longo da distribuição geográfica das espécies em coleções científicas, vinha dificultando a identificação da diversidade de espécies associadas à *Amphisbaena darwinii*. Nossos resultados corroboram a proposição de Gans (1966) em que considera as espécies *A. darwinii*, *A. trachura* e *A. heterozonata* um complexo de espécies proximamente relacionadas. Diferente do sugerido por Gans (1966), no entanto, não observamos intermediários morfológicos entre essas espécies, apenas falhas nas identificações dos indivíduos, o que dificultava a delimitação da distribuição geográfica desses táxons.

Além disso, nossos resultados indicam a existência de um novo táxon, *Amphisbaena grupoE* sp. nov., confundido com *A. darwinii trachura* (ver Gans 1966) e *A. darwinii* (ver Perez et al 2012). Essa nova espécie, mesmo morfológicamente mais similar à *Amphisbaena darwinii*, foi recuperado em um clado distinto, associado as espécies de pequeno porte relacionadas à *Amphisbaena munoai* e *A. prunicolor*.

Seguindo os conceitos para delimitação de espécies de Dayrat (2005) e Padial et al (2010), reconhecemos *Amphisbaena darwinii* como um complexo de espécies representado por pelo menos duas espécies candidatas não confirmadas (Grupos A – sul do Rio Grande do Sul e Grupo D – Uruguai), que apresentam divergências genéticas e morfológicas entre suas populações. Porém não apresentam caracteres morfológicos discretos que permita sua diagnose, sendo inconclusivo quanto a seu reconhecimento como linhagens independentes.

A descrição de um novo táxon e a reavaliação das espécies já conhecidas vem auxiliar na identificação das espécies e melhoram a compreensão da diversidade de *Amphisbaena* da região sul do Brasil, Uruguai e Argentina.

Referências

Achaval, F. (1987). Lista de las especies de vertebrados del Uruguay. Reptiles. División Publicaciones y Ediciones de la Universidad de la República. ii + 15pp.

Achaval, F. (1997). Actualización sistemática y sinonímica de los reptiles del Uruguay com comentários y distrbución. Tesis de Maestría em Biología, Opción Zoología, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Facultad de Ciencias, Unidersidad de la República, Montevideo. 693pp.

Avila, L.J., Montero, R. & Morando, M. (2000) Evaluación del estado de conservación de la fauna de lagartijas y anfisbénidos de la República Argentina. In: Lavilla, E.O., Richard, E.R., y Scrocchi, G.J. (Eds.) Categorización de Anfibios y Reptiles de Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, 108 pp

Avila, L. J.; Martines, L. E.; Morando, M. (2013). Checklist of lizards and amphisbaenians of Argentina: an update. *Zootaxa* 3616 (3): 201–238.

Bell, T. (1833). Characters of two new genera of reptiles. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1833(1): 97-101.

Burmeister, C.H.C. (1861) *Reise durch die La Plata-Staaten mit besonderer Rücksicht auf die physische Beschaffenheit und den Culturzustand der Argentinischen Republik. Ausgeführt in den Jahren 1857, 1858, 1859 und 1860. Halle: H.W. Schmidt, 2 vols. [1: vi1502; 2: vi1538 pp.]*

Camargo, A., Sites, Jr, J.W. (2013). Species Delimitation: a Decade After the Renaissance. Pp. 225-247. In: *The Species Problem: Ongoing Issues*. I.Y. Pavlinov (ed.). InTech – Open Access publisher, Rijeka, Croatia (<http://dx.doi.org/10.5772/52664>).

Carreira, S.; Meneghel, M.; Achaval, F. (2005). Reptiles de Uruguay. DIRAC/Facultad de Ciencias, Montevideo. 639p.

Cope, E. D. (1885). Twelfth contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the American Philosophical Society*, v. 22, n. 118, p. 167– 194.

Costa, H. C.; Bérnils, R. S. (2015). Répteis brasileiros: lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 4, p. 75-93.

Dayrat B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.

De Queiroz, K. (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. *In:*

Howard, D.J & Berlocher, S.H (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, Oxford, England, 57–75p.

De Queiroz, K. (2005). A Unified Concept of Species and Its Consequences for the Future of Taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, v.56, pp. 196–215.

De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Syst Biol*, 56:879-886.

Dirksen, L. e De la Riva, I. (1999). The lizards and amphisbaenians of Bolivia (Reptilia, Squamata): checklist, localities, and bibliography. *Graellsia* 55, 199-215

Duméril, A.M.C., & Bibron, G. (1839) *Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des reptiles*. Errata. De l'ordre des Lézards ou des Sauriens. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris, 5, I + VIII + 1–856pp.

Fouquet A., Gilles A., Vences M., Marty C., Blanc M. & Gemmel N.J. (2007). Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*, 2(10), 1109.

Funk, D. J.; Omland, K. E. (2003). "Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA". *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397–423.

Gamble, T. Colli, G. R.; Rodrigues, M. T.; Werneck, F. P.; Simons, A. M. (2012). Phylogeny and cryptic diversity in geckos (Phyllopezus; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America s open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 62, p. 943-953.

Gans, C. (1962). Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 3. Redefinition and description of the Brazilian reptiles *Amphisbaena silvestrii* Boulenger and *A. neglecta* Dunn and Piatt. *Copeia* 1962(1): 164–170.

Gans, C. (1963) Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 7. Redescription and redefinition of *Amphisbaena mitchelli* Procter and *Amphisbaena slevini* Schmidt from the Middle and Lower Amazon, Brazil. *American Museum Novitates*, 2127, 1–22.

Gans, C. (1964). Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 14. New records of *Amphisbaena silvestrii* Boulenger, and the description of a new two pored species from the northern Chaco. *Copeia* 1964(3): 553–561.

Gans, C. (1965) Notes on amphisbaenids. 17. Redescription and discussion of *Amphisbaena angustifrons* Cope and *A. camura* Cope, large amphisbaenids of southern South America (Amphisbaenia: Reptilia). *American Museum Novitates*, 2225, 1–32.

Gans, C. (1966) Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia) 3. The small species from southern South America commonly identified as *Amphisbaena darwini*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 134, 3, 185– 260.

- Gans, C. (1974). The holotype of *Amphisbaena mildei* Peters rediscovered. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 31(4): 201–203.
- Gans, C. (1978) The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. *Transactions of the Zoological Society of London*, 34, 347–416.
- Gans, C. (1987) Studies on amphisbaenians (Reptilia). 7. The small round-headed species (*Cynisca*) from western Africa. *American Museum Novitates*, 2896, 1–84.
- Gans, C. & Alexander, A.A. (1962) Studies on the amphisbaenids (Amphisbaenia; Reptilia). 2. On the amphisbaenids of the Antilles. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 128, 65–158.
- Geurgas, S.R. & Rodrigues, M.T. (2010) The hidden diversity of *Coleodactylus amazonicus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revealed by molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 583–593.
- Goloboff, P.A.; Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24:774-786.
- Gomes, J.; Maciel, A. O. (2012). A new species of *Amphisbaena* Linnaeus (Squamata, Amphisbaenidae) from the state of Maranhão, northern Brazilian Cerrado. *Zootaxa* 3572: 43–54.
- Gray, J. E. (1865). A revision of the genera and species of amphisbaenians with the descriptions of some new species now in the collection of the British Museum. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1865:442–455.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14812–14817.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755
- Katoh, S. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- Kearney, M. (2003) Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent fossil forms. *Herpetological Monographs*, 17, 1–74.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Klappenbach, M.A. (1960) Notas herpetológicas. I. *Amphisbaena munoai* n. sp. (Amphisbaenidae). *Comunicaciones en Zoologie do Museo Historia Naturel Montevideo*, 4, 1–12.

Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29 (6): 1695-1701.

Lema, T. de. (1994). Lista comentada de répteis ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Sér. Zool.* v. 7, p. 41-50.

Liebermann, J. (1939). Catálogo sistemático y zoogeográfico de lacertilios Argentinos. *Physis* 16: 61–82.

Linnaeus, C. von. (1758) *Systema naturae per regna tria naturae*. Editio deciman, reformata, Holmiae, Laurenti Salvii. 824p.

Macey, J. R.; Papenfuss, T. J.; Kuehla, J. V.; Fourcadea, H. M.; Boorea, J. L. (2004). Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 22–31.

Manly, B.F.J. (2000) *Multivariate Statistical Methods*, 2nd ed. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, Florida, USA.

Medrano, J.F.; Aasen, E. & Sharrow, L. (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1):43.

Melville, R.V. 1979. Opinion 1131. *Amphisbaena mildei* Peters, 1878 (Reptilia): suppressed under the Plenary Powers. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 36(2): 82–84.

Montero, R. (1994). Distribucion de los Amphisbaenidae em la Republica Argentina. *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina*, v 10, n1.

Montero, R. (1996) Lista de localidades de Amphisbaenia de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 10(1), 25–45.

Montero, R. e Terol, G. J. (1999). Los Amphisbaenidae em Paraguay, Listado Geografico, *Cuaderno Herpetologia* 13(1-2): 89-95.

Mott, T. & Vieites, D.R. (2009) Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molecular Phylogenetics* v. 51, p. 190-200.

Müller, L. (1941). Über die in der Sammlung des zoologischen Institutes der Universität Halle a. Saale aufbewahrten Amphibien und Reptilientypen. *Zeitschr. f. Naturwiss.* 94: 182-205

Noonan, B. P.; Chippindale, P. T. (2006). Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 347–358.

Oliver, P.M.; Adams, M.; Lee, M.S.; Hutchinson, M.N.; Doughty P. (2009). Cryptic diversity in vertebrates: molecular data double estimates of species diversity in a radiation of Australian lizards (*Diplodactylus*, Gekkota). *Proc. Roy. Soc. Biol. Sci. Ser. B*, 276, pp. 2001–2007

Palumbi, S.R., (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). *Molecular systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, pp. 205–247.

Padial, J. M.; De la Riva, I. (2009). Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zool. Journal of the Linnean Society*, 155(1):97 – 122.

Padial, J.M; Miralles, A; De la Riva, I; Vences, M (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7:16.

Pfenninger, M.; Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evol. Biol.*, 7, pp. 121–127

Pook, C. E., Wüster, W., Thorpe, R.S. (2000) Historical biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: viperidae: *Crotalus viridis*), inferred from mitochondrial DNA sequence information. *Molecular phylogenetics and evolution*, 15, 269–82.

Pinna, P. H.; Mendonça, A. F.; Bocchiglieri, A.; Fernandes, D. S. (2010). A new two-pored *Amphisbaena* Linnaeus from the endangered Brazilian Cerrado biome (Squamata: Amphisbaenidae). *Zootaxa*, 2569, 44-54.

Pinna, P. H.; Mendonça, A. F.; Bocchiglieri, A.; Fernandes, D. S. (2014). A New Species of *Amphisbaena* Linnaeus, 1758 from a Cerrado Region in Bahia, Northeastern Brazil (Squamata: Amphisbaenidae). *Herpetologica*, 70, 339-349.

Perez, R.; Ribeiro, S.; Borges-Martins, M. (2012). Reappraisal of the taxonomic status of *Amphisbaena prunicolor* (Cope 1885) and *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). *Zootaxa* 3550:1-25.

Peters, W. C. H. (1879). Über vier neue amerikanische *Amphisbaena*-Arten. *Monatsb. Akad. Wiss. Berlin*, pp. 778-781.

Recoder, R. S.; Werneck, F. P.; Teixeira, M.; Colli, G. R.; Sites, J. W.; Rodrigues, M. T. (2014). Geographic variation and systematic review of the lizard genus *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae), with the description of a new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171, 206–225.

Ribeiro, S; Castro-Mello, C.; Nogueira, C. (2009). New Species of *Anops* Bell, 1833 (Squamata, Amphisbaenia) from Jalapão Region in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 43 (1):21-28.

Roberto, I. J.; Brito, L. B. M.; Ávila, R. W. (2014). A new six-pored *Amphisbaena* (Squamata: Amphisbaenidae) from the coastal zone of northeast Brazil. *Zootaxa* 3753 (2): 167–176.

Ruiz-García, J. A., Curi, L. M., Lamas, M. L. e Céspedes, J. A. (2016). *Amphisbaena trachura* Cope, 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae): new record for the northeast of Argentina. *Check List* 12(3): 1883, 11 May 2016

Strauch, A. (1881). Bemerkungen über die Eidechsenfamilie der Amphisbaeniden. *Mel. Biol. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg* 11: 355-479 (reprinted: *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg* 28: 45-131)

SystatSoftware, Inc. (2006) SigmaPlot for Windows, version 10.0. San Jose, CA. Available from www.sigmaplot.com.

StatSoft, Inc. (2011) Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK: StatSoft. Available from www.statsoft.com/textbook.

StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.

Tamura, K.; Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Teixeira, M.; Dal Vechio, F.; Mollo Neto, A.; Rodrigues, M. T. (2014). A New Two-Pored *Amphisbaena* Linnaeus, 1758, from Western Amazonia, Brazil (Amphisbaenia: Reptilia). *South American Journal of Herpetology* 9 (1): 62-74.

Vanzolini, P.E. 1992. *Cercolophia*, a new genus for the species of *Amphisbaena* with a terminal vertical keel on the tail. *Pape'is Avulsos de Zoologia, Sa'õ Paulo* 37(27): 401–412.

Wagler, J. (1824). *Serpentum Brasiliensium Species Novae ou Histoire Naturelle des Espe`ces Nouvelles de Serpens*. Munich (Monachii): Franc. Seraph. Hiibschmann.

Werneck F.P., Leite R.N., Geurgas S.R., Rodrigues M.T. (2015) Bio- geographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 94

Vanzolini, P.E. (2002) An aid to the identification of the South American species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). *Papéis Avulsos de Zoologia do MZUSP*, 42, 15, 351–362.

Zar, J.H. (2010) *Biostatistical Analysis*. 5th edition. Upper Saddle River, New Jersey. Prentice Hall Inc. 944p.

Apêndice I

Material examinado - morfologia

***Amphisbaena grupoE* sp. nov. (N=25)**

BRASIL: SANTA CATARINA: *Angelina* (CHUFSC 711); *Rio Fortuna* (MCN 7310). RIO GRANDE DO SUL: *Torres* (MCN 2655, 2666, 2670–71, 6216–20, 6222, 6224); *Maquiné* (MCN 15461; UFRGS 4684); *Dom Pedro de Alcântara* (MCP 299, 4104); *Terra de Areia* (MCP 6660, 7009); *Morrinho do Sul* (UFRGS 5292 holótipo*, 5285).

***Amphisbaena darwinii* (N=59)**

BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: *Bagé* (MCP 6622); *Candiota* (UFRGS 5091); *Canguçu* (UFRGS 5944), *Jaguarão* (UFRGS 5052–5054, 5070, 5170, 5216, 5434), *Rio Grande* (UFRGS 5005–06).

URUGUAI: CANELONES: *Canelones* (MCP 11413), *San Jose de Carrasco km 21* (MNHN 2747), LAVALLEJA: *Ruta 12 Km 10* (MNHN 898, 3039); DURAZNO: *Arroio del Estado Km 18 Ene de la Paloma 7ª Sec. Jud.* (MNHN 5759); MALDONADO: *Punta del Este, Isla de Lobos* (ZVCR 2070–72, 2412; MNHN 3028), *Cerro de Las Animas* (MNHN 779, 3104–05); MONTEVIDEO: *Malvín* (ZVCR 1973, 2053, 2411; MNHN 1096), *Montevideo* (ZVCR 3957, 3963–3964, 4423, MHNP 3112 lectótipo*, MHNP 3107 lectoparátipo*, MHNP 3113 lectoparátipo*), *Barrio Ataguaupa* (MNHN 5971–73), *Barrio La Espada* (MNHN 3030, 3035–36), *Barrio Piedras Blancas* (MNHN 3027), *Barrio Pocitos* (MNHN 3032–33), *Barrio Prado* (ZVCR 3950), *Calle Gral. Fraga y Martin Garcia Barrio Aguada* (MNHN 2364), *Carrasco* (MNHN 212), *Instituto Geologico* (MNHN 214), *Parque Posadas* (ZVCR 3746), *Parque Rivera* (MNHN 3037), *Parque Zoologico Municipal - Calle Rivera* (MNHN 895), *Paso de la Arena* (MNHN 205), *Punta Carretas* (MNHN 901, 1097, 3040), *Punta Gorda* (MNHN 1622), *Tomas Gomensoro 3026* (MNHN 5689); RIO NEGRO: *Nuevo Berlin ayo la Yeguada* (MNHN 3034); ROCHA: *Arroio Chui – Chui* (MNHN 5836), *Kambarra Salina* (MNHN 5975), *La Coronilla* (MNHN 5944), *Salinas Marítimas* (ZVCR 4480); SAN JOSÉ: *Establecimiento 'El Relincho'* (ZVCR 4975), *Playa Grande - Parque Santa Teresa* (MNHN 3031).

***Amphisbaena heterozonata* (N=36)**

ARGENTINA: BUENOS AIRES: (MACN 40057, 40265), *Bella Vista* (MACN 25815, 36635–37), *Buenos Aires* (MACN 36640, 40057, 40265), *Lomas de Zamora*, Temperley (MACN 31391–92), *Moreno*, *Moreno* (MACN 25128), *Olarría*, *Sierras Bayas* (MACN 7795), *Tandil*, *Tandil* (MACN 11771, 24834–35, 25265–67), *Tornquist*, *Sierra de la Ventana* (MACN 32897, 32903, 33462); CÓRDOBA: *Pocho*, *Las Chacras* (MACN 33148–49), *Río Ceballos* (MACN 36197); MISIONES: *Misiones* (MACN 3761–62); SANTA FÉ: *Las Rosas*, *Las Rosas* (MACN 37148–51); TUCUMÁN: *Tucumán* (MACN 3831, 17861, 17890), *Río Chico*, *Aguilares* (MACN 25283 neótipo*, 25284).

***Amphisbaena trachura* (N=74)**

ARGENTINA: BUENOS AIRES: *Buenos Aires* (MACN 17839); ENTRE RIOS: *Gualeduaychú* (MACN 21273–75), MISIONES: *Misiones* (MACN 3760), *San Javier* (MCP 3331–32).

BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: *Alegrete* (UFRGS 4880, 4928–29, 4939, 5381, 5391), *Anita Garibaldi* (UFRGS 4572), , *Balneário Pinhal* (MCP 292), *Barra do Ribeiro* (MCP 4377), *Bom Jesus* (UFRGS 4011, 4971, 5084), *Cachoeira do Sul* (MCP 5764, 11545), *Camaquã* (UFRGS 5712), *Cambará do Sul* (MCN 4683, 5941–42; MCP 1700), *Campo Belo do Sul* (UFRGS 4688, 4978), *Canoas* (MCP 4637), *Cidreira* (MCP 4310), *Curumin* (MCP 6947), *Dom Feliciano* (MCP 12003), *Dom Pedrito* (MCP 18598), *Dom Pedro de Alcântara* (MCP 299, 4104), *Eldorado do Sul* (UFRGS 4677, 5232, 5528, 5665), *Encruzilhada do Sul* (MCP 7859), *Guaíba* (UFRGS 1953), *Imbé* (UFRGS 3507), *Ivoti* (UFRGS 4897), *Manoel Viana* (UFRGS 5393), *Maquiné* (MCN 15461; UFRGS 4684), *Montenegro* (ANSP 12988 holótipo*), *Novo Hamburgo* (UFRGS 145), *Osório* (UFRGS 1948), *Palmares do Sul* (MCP 5594), *Pinhal* (UFRGS 5762), *Porto Alegre* (MCP 14384, UFRGS 2087), *Porto Xavier* (MCP 11708), *Rosário do Sul* (UFRGS 4160), *Santa Maria* (UFRGS 1960), *Santana do Livramento* (UFRGS 4700, 5117, 5258–59, 5595), *São Francisco de Paula* (MCP 7594, 8588), *São Jerônimo* (UFRGS 6149, 6232), *São José do Norte* (UFRGS 3656), *São Sepé* (MCP 6119), *Taquara* (MCP 11737), *Tavares* (MCP 13581), *Terra de Areia* (MCP 6660, 7009, 12498), *Torres* (MCN 2655, 2666, 2670–71, 6216–20, 6222, 6224, MCP 329, 334), *Tramandaí* (MCP 12199), *Triunfo* (MCN 7384), *Uruguaiana* (MCP 6195), *Viamão* (MCP 18041; UFRGS 1968, 2252), *Vila Flores* (MCP 18517). SANTA CATARINA: *Angelina* (CHUFSC 711), *Araranguá* (MHNCI 3144), *Campos Novos* (MHNCI 4094; MCP 2844), *Curitibanos*

(CHUFSC 1052), *Fraiburgo* (MCP 10568), *Porto União* (MHNCI 6632, 6986, 7390, 7392–93, 7789, 7791, 10065), *Rio Fortuna* (MCN 7310). PARANÁ: *Antônio Olinto* (MHNCI 2963), *Carambeí* (MHNCI 11512), *Clevelândia* (MHNCI 10108), *Cruz Machado* (MHNCI 10331), *Guarapuava* (MHNCI 3299, 11532), *Guaratuba* (MHNCI 10), *Jaguariaíva* (MHNCI 2740), *Morretes* (MHNCI 3480), *Palmeira* (MHNCI 1147), *Piraí do Sul* (MHNCI 2548), *Ponta Grossa* (MHNCI 3479, 4129, 4441, 5805, 6179), *Porto Amazonas* (MHNCI 4558), *São João do Triunfo* (MHNCI 11869–72), *São Mateus do Sul* (MHNCI 337–38, 340), *Telêmaco Borba* (MHNCI 5786), *União da Vitória* (MHNCI 10064).

URUGUAI: ARTIGAS (MNHN 172); TACUAREMBÓ: *Tambores* (MNHN 20607), *Paso Manuel Dias* (MNHN 905), RIO NEGRO: *Sarandi de Navarra* (MNHN 860), RIVERA: *Escuela Agraria* (MNHN 3042–43).

Capítulo III

Sistemática filogenética do grupo de *Amphisbaena darwini* Duméril & Bibron 1839
(Amphisbaenia: Amphisbaenidae), baseado em caracteres morfológicos e moleculares

(Manuscrito a ser submetido à *Zootaxa*)

**Sistemática filogenética do grupo de *Amphisbaena darwini* Duméril & Bibron 1839
(Amphisbaenia: Amphisbaenidae), baseado em caracteres morfológicos e moleculares**

Renata Perez^{1*}, Márcio Borges-Martins¹

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal e Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, prédio 43435, sala 102, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: renattaperez@gmail.com

Título curto: Sistemática filogenética do grupo *Amphisbaena darwini*

Manuscrito a ser submetido a *Zootaxa*

Resumo

Amphisbaenidae é a mais diversa das seis famílias de Amphisbaenia, com 12 gêneros e 176 espécies reconhecidas, distribuídas no Caribe, América do Sul e África subsaariana. As hipóteses de relacionamento filogenético entre os táxons de Amphisbaenidae são escassas e instáveis, mas indicam que pelo menos um dos clados Africanos é o grupo irmão das espécies Sul-americanas e Caribenhas (Amphisbaeninae). Em relação às espécies de Amphisbaeninae, os gêneros tradicionalmente reconhecidos não se mostraram monofiléticos e foram sinonimizados à *Amphisbaena*. Essa decisão, seguida do uso do gênero *Leposternon*, tornou *Amphisbaena* um agrupamento parafilético. Através de uma revisão taxonômica, um complexo de espécies associados à *Amphisbaena darwini*, foi reconhecido. Essas espécies possuem características morfológicas similares e as hipóteses de relacionamento filogenético que em parte foram incluídas, parecem indicar um agrupamento natural, no entanto, com poucas evidências de sinapomorfias morfológicas. Buscando testar a monofilia do grupo de *Amphisbaena darwini* e sua relação com as demais espécies de *Amphisbaena*, utilizamos uma matriz com 4323 caracteres, sendo um total de 4271 pares de bases (quatro genes mitocondriais e quatro genes nucleares) e 51 caracteres de morfologia interna e externa. Nosso resultado corrobora a hipótese de monofilia do grupo. Além disso, reforça que a utilização da nomenclatura atual torna *Amphisbaena* um agrupamento parafilético. Estudos com a inclusão de um maior número de espécies são necessários para a tomada de decisões quanto as considerações taxonômicas a nível genérico entre as Amphisbaenidae Neotropicais.

Palavras chave: Amphisbaeninae, filogenia, América do Sul.

Introdução

Amphisbaenidae Gray 1865 é a mais diversa das seis famílias reconhecidas na ordem Amphisbaenia Gray 1844, com 12 gêneros e 176 espécies distribuídas no Caribe, América do Sul e África subsaariana (Gans 2005, Perez et al 2012, Measey & Tolley 2013, Costa & Bernils 2015, Uetz & Hosek 2016). Em relação as demais famílias, Amphisbaenidae é grupo irmão de Trogonophidae Gray 1865 formando o clado Afrobaenia Gauthier et al 2012, com provável origem africana, como sugerem diversos estudos (Kearney 2003, Kearney & Stuart 2004, Gauthier et al 2012, Measey & Tolley 2013, Pyron et al 2013, Longrich et al 2015,). As hipóteses de relacionamento filogenético dos táxons de Amphisbaenidae são ainda escassas e instáveis (ver Mott & Vieites 2009; Measey & Tolley 2013; Longrich et al 2015). As espécies Africanas não formam um grupo monofilético, no entanto, o clado com as espécies do gênero *Geocalamus* Günther 1880, *Dalophia* Gray 1865 e *Monopeltis* Smith 1848 são grupo irmão das espécies Sul-americanas e Caribenhas (Measey & Tolley 2013; Longrich et al 2015). Entre as espécies neotropicais, os táxons caribenhos formam um grupo monofilético, posicionado entre os demais clados com espécies Sul-americanas (Mott & Vieites 2009; Longrich et al 2015).

Em relação a morfologia, são reconhecidas sinapomorfias apenas para as famílias de Amphisbaenia (Kearney 2003; Conrad 2008; Gauthier et al 2012). O reconhecimento de gêneros e demais grupos em Amphisbaenidae é baseado apenas no compartilhamento de caracteres de morfologia externa, a maioria, contudo, sem um teste filogenético formal. Dentre as espécies Sul-americanas, o gênero *Amphisbaena* Linnaeus 1758, como tradicionalmente vinha sendo empregado (ver Gans 2005) não formava um grupo monofilético em relação aos demais gêneros, reconhecidos principalmente por apresentar formato da cabeça ou cauda modificados (*Anops* Bell 1833, *Aulura* Barbour 1914, *Bronia* Gray 1865, *Cercolophia* Vanzolini 1992 e *Leposternon* Wagler 1824), o que levou à proposta de sinonimização de todos a *Amphisbaena* (Mott & Vieites 2009). Ribeiro et al (2012) argumentarem contra a proposta de Mott & Vieites (2009) para manter *Leposternon*, sendo este o único gênero monofilético obtido através das análises (ver Mott & Vieites 2009, Pyron et al 2013, Longrich et al 2015) e que apresenta características morfológicas distintas de todos os demais (Ribeiro et al 2012). Esse arranjo tornou *Amphisbaena* parafilético, mas é utilizado para evitar novas mudanças taxonômicas neste grupo que apresenta relacionamento filogenético ainda instável (Costa & Bérnils 2015). A delimitação de muitos grupos (gêneros

ou agrupamentos intra-genéricos), portanto, é tentativa e teve como base associações taxonômicas tradicionais entre as espécies morfologicamente mais similares (ver Vanzolini 1951; Gans 1962, 1966, 1971). Caracteres merísticos ou de escutelação cefálica, amplamente empregados no reconhecimento de grupos, têm significância filogenética incerta. A falta de informações em níveis específicos e genéricos em *Amphisbaena* é um impedimento que dificulta a identificação taxonômica, sendo um dos principais problemas encontrados nos estudos de hipóteses filogenéticas do grupo (Kearney 2003).

Gans (1966), ao revisar as espécies de *Amphisbaena* do sul da América do Sul, reconheceu um complexo de espécies comumente identificadas como *Amphisbaena darwinii* Duméril & Bibron 1839. A associação inicial entre essas espécies não é clara, sendo baseada principalmente no compartilhamento de caracteres morfológicos e distribuição geográfica com áreas de simpatria no Rio Grande do Sul (Brasil), Uruguai e Argentina. Todas as oito espécies associadas inicialmente: *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885, *A. darwinii*, *A. heterozonata* Burmeister 1861, *A. hoguei* Vanzolini 1950, *A. munoai*, *A. nigricauda* Gans 1966, *A. prunicolor* (Cope 1885) e *A. trachura* Cope 1885 (Gans 1966; Perez et al 2012); em algum momento foram identificadas, determinadas como subespécies ou descritas a partir de *A. darwinii*. Os caracteres morfológicos que essas espécies compartilham, como o número de anéis do corpo próximo a 200, menos de 40 segmentos no anel do meio do corpo e quatro poros pré-cloacais (Gans 1966), também são encontrados em demais espécies de *Amphisbaena* e não apresentam evidência de significância filogenética. No entanto, *Amphisbaena darwinii* (reidentificada como *A. trachura*) e *A. munoai* têm sido hipotetizadas como espécies irmãs em todas hipóteses filogenéticas disponíveis (ver Mott & Vieites 2009; Measey & Tolley 2013; Longrich et al 2015). Estudos recentes (ver Capítulo I e Capítulo II) que incluem mais espécies do grupo *darwinii* (*A. prunicolor*, *A. heterozonata* e *A. darwinii*), descrevem novos táxons e reforçam que a associação proposta por Gans (1966) pode realmente formar um grupo natural. No entanto, não são conhecidas sinapomorfias para o grupo.

O presente trabalho, portanto, teve como objetivo apresentar uma hipótese de relacionamento filogenético das espécies associadas à *Amphisbaena darwinii* (grupo *darwinii* de Gans 1966), testando se as mesmas formam um grupo monofilético e discutindo a relação destas com os demais grupos de *Amphisbaena*.

Material e Métodos

Seleção de Táxons

Para testar o relacionamento filogenético entre as espécies associadas à *Amphisbaena darwinii*, incluímos como grupo interno todas as nove espécies disponíveis: *Amphisbaena darwinii* [incluída como duas linhagens conforme Capítulo II: *A. darwinii* (Grupo A, sul do Rio Grande do Sul, Brasil) e *A. darwinii* (Grupo D, Uruguai)], *A. heterozonata*, *A. munoai*, *A. prunicolor*, *A. trachura*, *Amphisbaena grupo1*, *Amphisbaena grupo2*, *Amphisbaena grupo3* (ver Perez & Borges-Martins – Capítulo I) e *Amphisbaena grupoE* (ver Perez & Borges-Martins – Capítulo II). *Amphisbaena albocingulata*, *A. hogei* e *A. nigricauda* são espécies raras em coleções científicas, o que impossibilitou a preparação de peças anatômicas e a obtenção de tecidos para análises moleculares. Estas espécies foram incluídas apenas nas comparações com base na sua morfologia externa, não sendo incluídas nas análises filogenéticas.

A escolha do grupo externo foi baseada nas filogenias moleculares de Mott & Vieites (2009) e Longrich et al (2015), visando incluir um conjunto de espécies representativo da diversidade filogenética apresentada nestes trabalhos. O grupo foi composto por *Amphisbaena kingii* (Bell 1833) e *A. angustifrons* Cope 1861, espécies supostamente muito próximas a *A. trachura* e *A. munoai*, e *Amphisbaena anaemariae* Vanzolini 1997, *A. silvestrii* Boulenger 1902 e *A. leeseri* Gans 1964 grupos irmãos subsequentes. Também foram incluídas espécies de *Amphisbaena* previamente pertencentes aos gêneros *Aulura* [*Amphisbaena anomala* (Barbour 1914)], *Bronia* [*A. brasiliana* (Gray 1865), *A. kraoh* (Vanzolini 1971) e *A. saxosa* (Castro-Mello 2003)], *Cercolophia* [*A. roberti* Gans 1964 e *A. cuiabana* (Strussmann & Carvalho 2001)] e *Leposternon* [*L. microcephalum* Wagler 1824, *L. infraorbitale* (Berthold 1859) e *L. polystegum* (Duméril 1851)]. Além destas, foram incluídas outras espécies sul-americanas (*Amphisbaena alba* Linnaeus 1758, *A. fuliginosa* Linnaeus 1758, *A. mertensii* Strauch 1881, *A. hastata* Vanzolini 1991, *A. ignatiana* Vanzolini 1991, *A. vermicularis* Wagler 1824, *A. camura* Cope 1862 e *A. bolivica* Mertens 1929) e caribenhas [*A. fenestrata* (Cope 1861), *A. caeca* Cuvier 1829, *A. cubana* Gundlach & Peters 1878, *A. schimidtii* Gans 1964 e *A. xera* Thomas 1966) de clados mais distantes. *Geocalamus acutus* Sternfield 1912 foi incluído como representando Africano e grupo irmão de Amphisbaenidae e *Trogonophis wiegmanni* Kaup 1830 foi incluído como raiz, totalizando 29 táxons como grupo externo.

Seleção de Caracteres

Caracteres moleculares

A extração de DNA de amostras de tecido muscular ou fígado, preservados em álcool 90%, foi realizada de acordo com a metodologia de Medrano et al. (1990) com modificações. Para muitos táxons obtivemos as sequências diretamente do GenBank (NCBI) (Apêndice 1). Foram selecionados oito genes para estudo, quatro mitocondriais e quatro nucleares. Obtivemos sequências parciais dos genes mitocondriais RNA ribossomal 12S (12S), RNA ribossomal 16S (16S), citocromo b (CYTB), NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2), e os genes nucleares neurotrofina-3 (NT3), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), protooncogene c-mos (CMOS) e gene de recombinação-ativação 1 (RAG), através de reações de cadeia de polimerase (PCR) com primers descritos na literatura: Kocher et al. (1989) (12S); Palumbi 1996 (16S); Pook et al. 2000 (CYTB); Macey et al 2004 (ND2); Noonan & Chippindale 2006 (NT3); Vieites et al 2007 (BDNF); Kearney & Stuart 2004 (RAG e CMOS), Tabela 1.

As amplificações foram realizadas em reações com 20 µl de volume contendo 10–50ng de DNA, 1X Buffer, 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase, além de 1 µl de Triton 4%. Os diferentes ciclos de amplificação foram realizados de acordo com as descrições recomendadas em literatura ou testadas neste estudo (Tabela 1). Os produtos de PCR foram verificados via eletroforese em gel de agarose 1% com DNA corado com GelRed em 1mL de BFB 10%. Os produtos considerados satisfatórios foram purificados utilizando ExoSAP (exonuclease I e shrimp alkaline phosphatase) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen, Seul, Coréia do Sul.

As sequências obtidas foram alinhadas para cada gene independentemente através do software Geneious 6.1.6 (Kearse et al., 2012), utilizando Mafft Multiple Alignment plugin (Kato 2013), seguindo o algoritmo G-INS-i com definições padrão (abertura de gap = 1.53, extensão de gap = 0.123). As sequências alinhadas foram posteriormente concatenadas em uma única matriz no software Mesquite (Maddison & Maddison, 2009).

Caracteres Morfológicos

Os caracteres morfológicos foram baseados nas análises de morfologia externa e osteologia craniana e pós-craniana. Para alguns táxons, a análise dos caracteres foi realizada através do material disponível no projeto DigiMorph (Digital Morphology 2014) ou de descrições disponíveis em literatura (Castro-Mello 2003; Gans 1962, 1964, 1965, 1966, 1971a, 1971b; Vanzolini 1950, 1971, 1991, 1994, 1999; Gans & Alexander 1962; Gans & Montero 2008; Thomas 1966; Thomas & Hedges 1998; Montero & Gans 1999; Zangerl 1944, 1945).

A escutelação cefálica seguiu arranjo descrito em Gans & Alexander (1962) e Gans (1987) (Figura 1). Para a análise da morfologia craniana e pós-craniana foi utilizada técnica de diafanização seguindo a metodologia de Taylor & Van Dike (1985) e para preparação somente de crânios utilizamos Alves et al. (1980). A terminologia para descrição dos caracteres osteológicos seguiu Montero & Gans (1999) e Gans & Montero (2008) (Figura 2).

Consideramos um caractere como uma série de transformações de estágios de expressão de uma determinada estrutura (Grant & Kluge 2004), sendo variáveis independentes e seus estados como condições mutualmente exclusivas de um caractere (Serenio 2007). Caracteres descritos nas filogenias de Estes et al (1988), Lee (1998), Kearney (2003), Conrad (2008) e Gauthier et al (2012) foram utilizados sem modificação ou reavaliados e recodificados para melhor aplicação nos táxons em estudo. Para a construção da matriz morfológica e exportação para outros formatos utilizamos o software Mesquite (Maddison & Maddison, 2004).

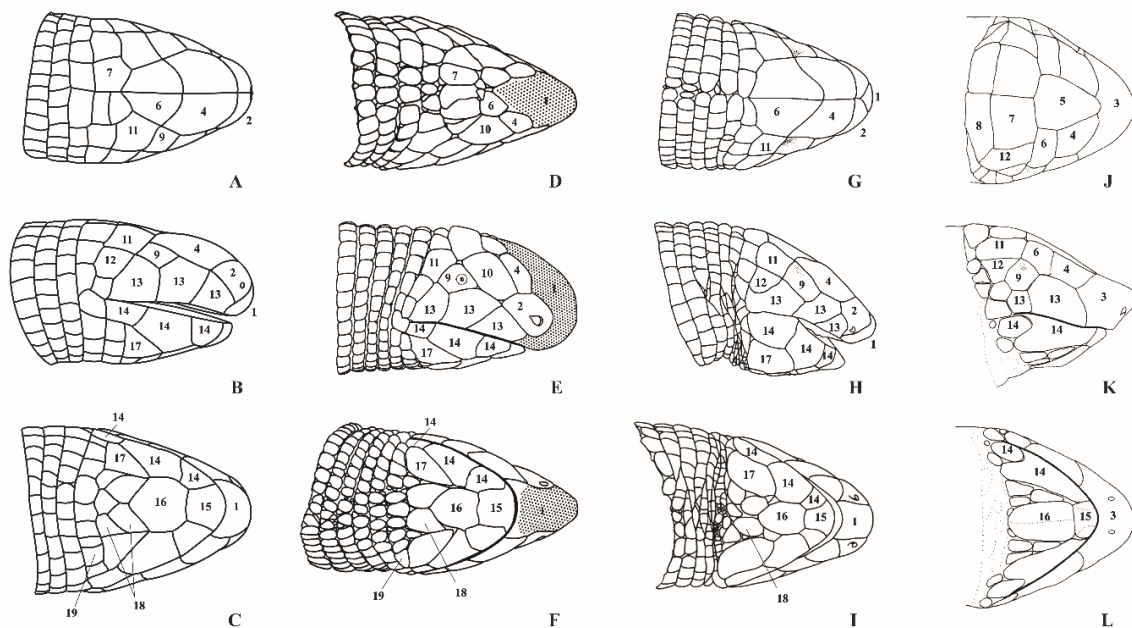


Figura 1. Padrão de escutelação cefálica de Amphisbaenidae, segundo Gans & Alexander (1962) e Gans (1987). A – C: *Amphisbaena prunicolor*; D – F: *A. kingii* (Gans 1964); G – I: *A. anomala* (Gans 1971a); J – L: *Leposternon microcephalum* (Gans 1971b). 1: rostral; 2: nasal; 3: rostronasal; 4: pré-frontal; 5: ázigo; 6: frontal; 7: parietal; 8: occipital; 9: ocular; 10: pré-ocular; 11: pós-ocular; 12: temporal; 13: supralabial; 14: infralabial; 15: mental anterior; 16: mental posterior; 17: malar; 18: pós-genial; 19: pós-malar.

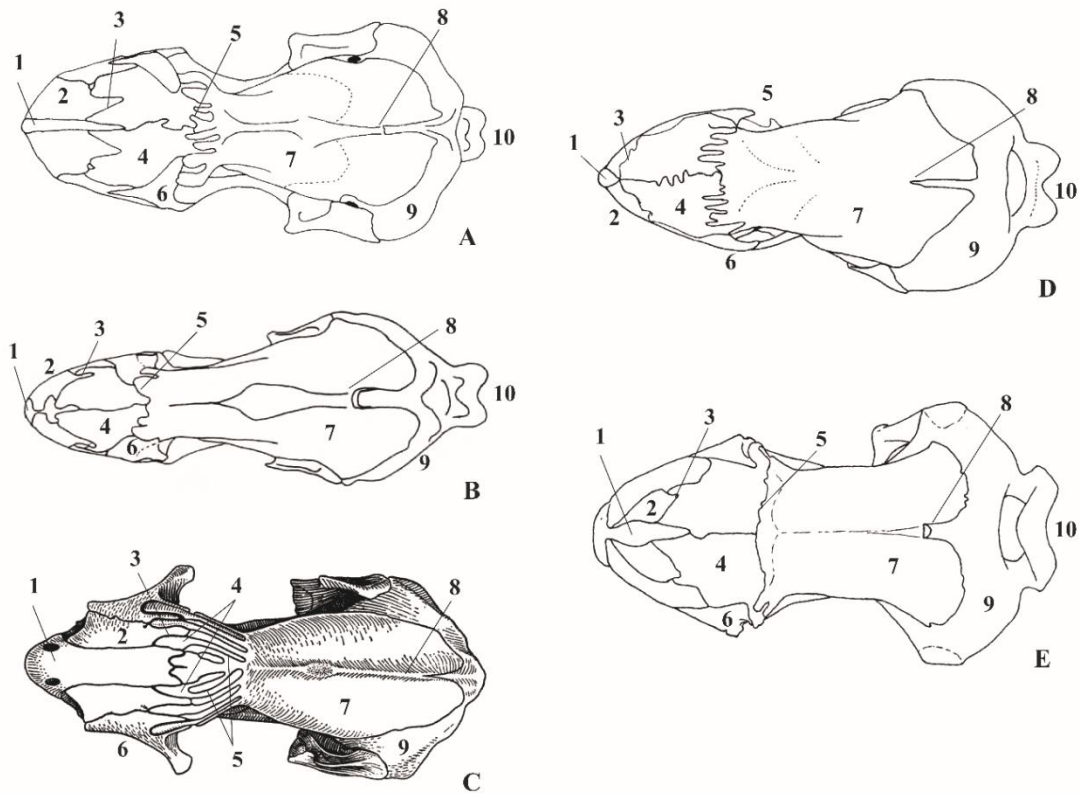


Figura 2. Padrão craniano dorsal de Amphisbaenidae (A, B, D e E) e Trogonophidae (C), segundo Montero & Gans (1999) e Gans & Montero (2009). A: *Amphisbaena heterozonata* (Gans & Montero 2009); B: *A. roberti* (Gans & Montero 2009); C: *Trogonophis wiegmanii* (Gans 1960); D: *Geocalamus acutus* (Gans & Montero 2009); E: *Leposternon microcephalum* (Gans & Montero 2009). 1: pré-maxilar; 2: nasal; 3: sutura nasofrontal; 4: frontal; 5: sutura frontoparietal; 6: maxilar; 7: parietal; 8: crista sagital; 9: occipital; 10: côndilo occipital.

Análise Filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os caracteres morfológicos e moleculares concatenados, através de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB). A maioria dos caracteres morfológicos são qualitativos e descritos como binários ou multiestado. Todos os caracteres (morfológicos e moleculares) foram considerados não ordenados, igualmente pesados e codificados de maneira que a mesma matriz pudesse ser testada para as duas metodologias.

A análise de Máxima Parcimônia foi realizada no software TNT (Goloboff et al. 2008), através da busca por árvores com menor número de passos, utilizando o método de ‘New Technology Search’ com 1 random seed e os algoritmos ‘Ratchet’ (com 20 interações),

‘Drift’ (com 20 ciclos) e ‘Tree fusing’ (100 *rounds*). A análise de Inferência Bayesiana foi realizada no software MrBayes 3.2 (Ronquist et al 2012) com 300 milhões de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), amostradas a cada 1000 passos e os primeiros 10% dos passos foram descartados como *burn-in*. Os modelos nucleotídeo foram selecionados utilizando o software Partition Finder v1.1.0 (Lanfear et al 2012), através do critério de informação de Akaike (AIC). Para os dados morfológicos o modelo selecionado foi Markov k (Lewis 2001, Nylander et al. 2004).

Resultados

Caracteres

Obtivemos um total de 4323 caracteres (98,8% moleculares, 1,2% morfológicos). Os caracteres moleculares corresponderam à 4272 pares de base, com 901 sítios parcimônia informativos para os oito genes concatenados (Tabela 2). Os dados morfológicos corresponderam a uma matriz com total de 51 caracteres, sendo 20 de morfologia externa e 31 de morfologia interna (Apêndice 2). Do total, 31 caracteres foram retirados de filogenias já existentes observada (Estes et al. 1998, Lee 1998, Kearney 2003, Conrad 2008 e Gauthier et al. 2012) e utilizados sem modificações ou modificados para melhor representar a variação e 20 são caracteres morfológicos, testados pela primeira vez no presente estudo.

Análise filogenética

Para o conjunto de dados, os resultados das análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana foram similares apenas na reconstrução de alguns agrupamentos. Na análise de Parcimônia, obtivemos 67 árvores (CI: 0,414; RI: 0,467) com 5215 passos através do algoritmo *Tree-fusing* (Apêndice 4) com baixo suporte nos ramos. Devido ao maior suporte entre os ramos e melhor resolução quanto ao posicionamento das espécies, utilizamos a árvore de Inferência Bayesiana para os comentários acerca dos resultados (Figura 13).

Nossos resultados corroboram estudos prévios que consideram *Geocalamus acutus* espécie irmã de Amphisbaeninae, subfamília que inclui todas as espécies Neotropicais de Amphisbaenidae (Mott & Vieites 2009, Measey & Tolley 2013, Longrich et al 2015). Em relação à Amphisbaeninae, obtivemos três grandes agrupamentos. A relação entre esses agrupamentos, no entanto, não é bem resolvida, sendo recuperados em politomia. O primeiro [Figura 13(I)], com *Amphisbaena fuliginosa* (espécie-tipo do gênero *Amphisbaena*) e demais espécies de grande porte, encontradas na porção centro-norte da América do Sul em

ambientes de Cerrado, Amazônicos e de Caatinga. Neste clado estão as espécies formalmente identificadas como gênero *Bronia* e *Amphisbaena roberti*, espécie tipo do gênero *Cercolophia*. O segundo agrupamento [Figura 13(II)] corresponde às espécies de *Amphisbaena* do Caribe. Essas espécies foram recuperadas como um grupo monofilético em todas as hipóteses filogenéticas disponíveis, tanto quando incluídas em maior ou menor diversidade (Mott & Vieites 2009, Longrich et al 2015). Nossos resultados corroboram esses estudos, reforçando a relação entre esses táxons, que merecem uma melhor avaliação em busca de caracteres morfológicos que indiquem sinapomorfias adicionais. O terceiro agrupamento [Figura 13(III)] corresponde às espécies de Amphisbaeninae com focinho em forma-de-pá como grupo irmão das espécies do grupo *darwinii* e demais táxons relacionados.

Nosso resultado também corrobora a associação taxonômica de Gans (1966) e recupera o grupo *darwinii* como monofilético. As nove espécies disponíveis analisadas possuem diversas sinapomorfias moleculares e o formato duplo do ectopterigóide [Caractere 37(0)] como sinapomorfia morfológica independente de otimização. Esse estado de caractere, no entanto, é observado em outras espécies de *Amphisbaena* do clado I. A relação entre as espécies do grupo *darwinii* é similar ao observado em estudos anteriores (ver Perez & Borges-Martins – Capítulo II), formado por dois cladogramas. O primeiro [Figura 13(A)] com *Amphisbaena darwinii* (linhagem RS) + *A. trachura* como espécies irmãs de *A. darwinii* (linhagem UR); e *A. heterozonata* como espécie irmã de todas. E o segundo [Figura 13 (B)] com uma politomia entre *Amphisbaena prunicolor*, *Amphisbaena* grupo1 + *A. grupoE* e *A. grupo2* + *A. munoai* + *A. grupo3*. A relação entre as espécies do clado B é menos resolvida que o obtido em análises anteriores (ver Perez & Borges-Martins – Capítulo II), provavelmente devido à inclusão de caracteres de morfologia interna que não apresentam variação entre essas espécies. Na análise de parcimônia, a monofilia do grupo *darwinii* também é observada (Apêndice 3). Não foi possível confirmar se *Amphisbaena albocingulata*, *A. hogei* e *A. nigricauda* fazem parte do grupo *darwinii*. Todos os caracteres que indicam possíveis sinapomorfias para o grupo, mesmo com uma otimização mais flexível, são relacionados a morfologia interna, caracteres que não foram observados nesses três táxons.

Amphisbaena kingii é a espécie irmã do grupo *darwinii* e *A. angustifrons* e *A. leeseri* as espécies irmãs subsequentes [Figura 13 (C)], com baixo suporte entre as relações de *Amphisbaena angustifrons* e *A. kingii* + grupo *darwinii*. A relação entre essas espécies foi recuperada de forma divergente na Máxima Parcimônia e em outros estudos que ou recuperam *Amphisbaena angustifrons*, *A. leeseri* e *A. kingii* em politomia com *A. darwinii* + *A. munoai* (ver Apêndice 3, Mott & Vieites 2009) ou recuperam *A. leeseri* como espécie

irmão de *A. angustifrons* + *A. kingii* e *A. darwinii* + *A. munoai* (ver Longrich et al 2015). Em relação a morfologia, esse grupo de espécies apresenta como sinapomorfia independente de otimização a presença da fileira de escudos pós-malares [Caractere 12(1)], estado de caractere que, no entanto, é observado em outras espécies nos clados I e II. *Amphisbaena anaemariae* + *A. silvestrii* são recuperadas como grupo irmão do clado C. Este conjunto de espécies [Figura 13 (D)], apresenta como sinapomorfia morfológica o formato duplo na sutura naso-frontal [Caractere 30(2)]. Esse estado de caractere não é observado em nenhuma outra espécie, sendo perdido, dentro deste grupo, em *Amphisbaena kingii*. Essas espécies são encontradas na região centro-sul da América do Sul, em ambientes de Cerrado, Chaco e Pampa. As modificações cranianas de *Amphisbaena kingii* indicam que a estratégia de escavação que utiliza, distinta dos demais táxons, pode ter evoluído independentemente.

Nossos resultados reforçam que a nomenclatura utilizada hoje, incluindo *Amphisbaena* e *Leposternon* torna o gênero *Amphisbaena* um agrupamento parafilético (Costa & Bérnils 2015). Reforçam também, a existência de diferentes linhagens em *Amphisbaena* [sensu Gans (2005)] que não correspondem totalmente aos gêneros tradicionalmente reconhecidos (ver Mott & Vieites 2009; Measey & Tolley 2013, Longrich et al 2015). No entanto, sugerem que as espécies tradicionalmente associadas à *Amphisbaena darwinii* representam um agrupamento natural monofilético. Estudos com a inclusão de um maior número de espécies são necessários para a tomada de decisões quanto às considerações taxonômicas, em níveis genéricos, de Amphisbaenidae Neotropicais.

Referências

Alves, M. L.; Vieira, M. I.; Fabián-Beurmann, M. E. (1980) Contribuição ao conhecimento da osteologia craniana de *Ophiodes striatus* (Spix, 1824) (Lacertilia – Anguidae). *Iheringia, série Zoologia*, 55, 121–135.

Castro-Mello, C. (2003) Nova espécie de *Bronia* Gray, 1845 do estado do Tocantins, Brasil (Squamata: Amphisbaenidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 43, 139–143.

Conrad, J. L. (2008) Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 310, 1–182.

Costa, H. C.; Bérnils, R. S. (2015). Répteis brasileiros: lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 4, p. 75–93.

Digital Morphology: A National Science Foundation Digital Library at the University of Texas at Austin. (2014). Available at <http://www.digimorph.org>

Estes, R. D.; de Queiroz, K.; Gauthier, J. (1988) Phylogenetic relationships within squamata. In: Estes, R. D.; Pregill, G. K., *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families: Essays Commemorating Charles L. Camp*. Stanford University Press, pp.119–281.

Gans, C. (1960) Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 1. A taxonomic revision of the trogonophidae, and a functional interpretation of the amphisbaenid adaptive pattern. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 119, 129–204.

Gans, C. (1962). Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 3. Redefinition and description of the Brazilian reptiles *Amphisbaena silvestrii* Boulenger and *A. neglecta* Dunn and Piatt. *Copeia*, 1962(1), 164–170.

Gans, C. (1964) Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia). 11. On *Amphisbaena schmidtii*, a third species of the genus from Puerto Rico (Amphisbaenia: Reptilia). *Breviora*, 198, 1–11.

Gans, C. (1965) Notes on amphisbaenids. 17. Redescription and discussion of *Amphisbaena angustifrons* Cope and *A. camura* Cope, large amphisbaenids of southern South America (Amphisbaenia: Reptilia). *American Museum Novitates*, 2225, 1–32.

Gans, C. (1966) Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia) 3. The small species from southern South America commonly identified as *Amphisbaena darwini*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 134, 3, 185–260.

Gans, C. (1971a) Redescription of three monotypic genera of amphisbaenians from South America: *Aulura* Barbour, *Bronia* Gray and *Mesobaena* Mertens. *American Museum Novitates*, 2475, 1–32.

- Gans, C. (1971b) Studies on Amphisbaenians. (4). A review of the amphisbaenid genus *Leposternon*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 144 (6). 379–464.
- Gans, C. (1974). *Biomechanics: An Approach to Vertebrate Biology*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pennsylvania. 261 pp.
- Gans, C. (1978) The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. *Transactions of the Zoological Society of London*, 34, 347–416.
- Gans, C. (1987) Studies on amphisbaenians (Reptilia). 7. The small round-headed species (*Cynisca*) from western Africa. *American Museum Novitates*, 2896, 1–84.
- Gans, C. (2005) Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 289, 1–130.
- Gans, C. & Alexander, A.A. (1962) Studies on the amphisbaenids (Amphisbaenia; Reptilia). 2. On the amphisbaenids of the Antilles. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 128, 65–158.
- Gans, C., & Montero, R. (2008) An Atlas of Amphisbaenian Skull Anatomy. *In: Biology of the Reptilia*, vol. 21 (The Skull and Appendicular Locomotor Apparatus of Lepidosauria) (C. Gans, A. S. Gaunt, and K. Adler, eds.). Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York, *Contrib. Herpetol.*, vol. 24, pp. 621–738.
- Gauthier, J. A.; Kearney, M.; Maisano, J. A.; Rieppel, O.I.; Behlke, A. D. B. (2012) Assembling the Squamate Tree of Life: Perspectives from the Phenotype and the Fossil Record. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 53(1), 3–308.
- Goloboff, P. A.; Farris, J. S.; Nixon, K. C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786.
- Grant, T.; Kluge, A.G. (2004) Transformation series as an ideographic character concept. *Cladistics*, 20, 23–31.
- Gray, J. E. (1865). A revision of the genera and species of amphisbaenians with the descriptions of some new species now in the collection of the British Museum *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1865, 442–455.
- Katoh, S. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772–780.
- Kearney, M. (2003) Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent fossil forms. *Herpetological Monographs*, 17, 1–74.
- Kearney, M.; Stuart, B. L. (2004). Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *The Royal Society*, 271, 1677–1683.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.

Kocher, T. D.; Thomas, W. K.; Meyer, A.; Edwards, S. V.; Paabo, S.; Villablanca, F. X.; Wilson, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6196–6200.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29 (6), 1695–1701.

Lee, M. S. Y. (1998). Convergent evolution and character correlation in burrowing reptiles: towards a resolution of squamate relationships. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65, 369–453.

Lewis, P. O. (2001) A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*, 50, 913–925.

Longrich, N. R.; Vinther, J.; Pyron, R. A.; Pisani, D.; Gauthier, J. A.. (2015) Biogeography of worm lizards (Amphisbaenia) driven by end-Cretaceous mass extinction. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, 282, 20143034.

Macey, J. R.; Papenfuss, T. J.; Kuehla, J. V.; Fourcade, H. M.; Boorea, J. L. (2004). Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 22–31.

Maddison, W. P.; Maddison, D. R. (2009) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.72 Available at <http://mesquiteproject.org>

Measey, G. J.; Tolley, K. A. (2013) A molecular phylogeny for sub-Saharan amphisbaenians, *African Journal of Herpetology*, 62:2, 100–108.

Medrano, J.F.; Aasen, E. & Sharrow, L. (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1), 43.

Montero, R. & Gans, C. 1999. The head skeleton of *Amphisbaena alba* Linnaeus. *Annals of the Carnegie Museum*, 1(68), 16–80.

Mott, T.; Vieites, D. R. (2009) Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 190–200.

Noonan, B. P.; Chippindale, P. T. (2006). Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40, 347–358.

Nylander J. A. A., Ronquist F., Huelsenbeck J. P., Nieves-Aldrey J. L. (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, 53, 47–67.

Palumbi, S. R.. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). *Molecular systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, pp. 205–247.

Perez, R.; Ribeiro, S.; Borges-Martins, M. (2012). Reappraisal of the taxonomic status of *Amphisbaena prunicolor* (Cope 1885) and *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). *Zootaxa*, 3550, 1–25.

Pook, C. E.; Wüster, W.; Thorpe, R.S. (2000) Historical biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: viperidae: *Crotalus viridis*), inferred from mitochondrial DNA sequence information. *Molecular phylogenetics and evolution*, 15, 269–82.

Pyron, R.A.; Burbrink, F. T.; Wiens, J. J. (2013) A phylogeny and updated classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 93.

Ribeiro, S.; Nogueira, C.; Cintra, C. E. D.; Silva, N. J.; Zaher, H. (2012) Description of a New Pored *Leposternon* (Squamata, Amphisbaenidae) from the Brazilian Cerrado. *South American Journal of Herpetology*, 6, 177–188.

Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D. L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P (2011b) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice, across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.

Sereno, P. C. (2007) Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23, 565–587.

Taylor, W. R.; Van Dyke, G. C. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9, 107–119.

Thomas, R. (1966) Additional notes on the amphisbaenids of Greater Puerto Rico. *Breviora*, 249, 1–23.

Thomas, R.; Hedges, S.B. (1998) A new amphisbaenian from Cuba. *Journal of Herpetology*, 32(1), 92–96.

Uetz, P.; Hošek, J. (eds.) (2016). *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org>, accessed April 17, 2016.

Vanzolini, P.E. (1950) Contribuições ao conhecimento dos lagartos brasileiros da família Amphisbaenidae Gray, 1825. I. Sobre uma nova subespécies insular de *Amphisbaena darwini* D. and B., 1839. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 9, 69–77.

Vanzolini, P. E. (1951). A systematic arrangement of the family Amphisbaenidae (Sauria). *Herpetologica*, 7(3), 113–123.

Vanzolini, P.E. (1991) Two new small species of *Amphisbaena* from the fossil dune field of the Middle Rio São Francisco, State of Bahia, Brasil (Reptilia, Amphisbaenia). *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo*, 37, 17, 259–276.

Vanzolini, P.E. (1994) A new species of *Amphisbaena* from the state of São Paulo (Reptilia, Amphisbaenia, Amphisbaenidae). *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo*, 39, 3, 29–32.

Vanzolini, P.E. (1999) On *Anops* (Reptilia: Amphisbaenia: Amphisbaenidae). *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo*, 41, 1, 1–37.

Vieites, D. R.; Min, M. S.; Wake, D. B. (2007) Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19903–19907.

Wagler, J. (1824). *Serpentum Brasiliensium Species Novae ou Histoire Naturelle des Espèces Nouvelles de Serpens*. Munich (Monachii): Franc. Seraph. Hiibschmann, p.72.

Zangerls, R. (1944) Contributions to the osteology of the skull of the Amphisbaenidae. *American Midland Naturalist*, 31(2), 417–454.

Zangerls, R. (1945) Contributions to the osteology of the pos-cranial skeleton of the Amphisbaenidae. *American Midland Naturalist*, 33(3), 764–780.

Apêndice 1

Tabela A. Lista completa de espécies incluídas nas análises.

Espécie	12S	16S	CYTB	ND2	BDNF	CMOS	NT3	RAG
<i>Amphisbaena alba</i>	UFRGS 4174	UFRGS 4174		UFRGS 4174	UFRGS 4174	UFRGS 4174		UFRGS 4174
<i>A. anaemariae</i>		FJ441668		FJ441911	FJ441851	FJ441728		FJ441788
<i>A. angustifrons</i>	UFRGST 4056	UFRGST 4056		UFRGST 4056	UFRGST 4056	UFRGST 4056		UFRGST 4056
<i>A. anomala</i>		FJ441712		FJ441955	FJ441895	FJ441772		FJ441832
<i>A. bolivica</i>		FJ441670		FJ441913	FJ441853	FJ441730		FJ441790
<i>A. brasiliiana</i>		FJ441708		FJ441951	FJ441891	FJ441768		FJ441828
<i>A. caeca</i>	EU203647	FJ441671		FJ441914	FJ441854	FJ441731		FJ441791
<i>A. camura</i>		FJ441672		FJ441915	FJ441855	FJ441732		FJ441792
<i>A. cubana</i>	EU203649	EU203649			EU203609	AY487346	EU203626	AY487365
<i>A. cuiabana</i>		FJ441696		FJ441939	FJ441879	FJ441756		FJ441816
<i>A. darwini</i> (RS)		UFRGST 0446	UFRGST 0446		UFRGST 0446		UFRGST 0446	UFRGST 0446
<i>A. darwini</i> (UR)	UFRGST 4047	UFRGST 4047	UFRGST 4047	UFRGST 4047	UFRGST 4047	UFRGST 4047	UFRGST 4047	UFRGST 4047
<i>A. fenestrata</i>	EU203650	EU203650						
<i>A. fuliginosa</i>		FJ441683		FJ441926	FJ441866	FJ441743		FJ441803
<i>A. grupo1</i>	UFRGST 1940	UFRGST 1940	UFRGST 1940	UFRGST 1940	UFRGST 1940	UFRGST 1940	UFRGST 1940	
<i>A. grupo2</i>	UFRGST 1963	UFRGST 1963	UFRGST 1963	UFRGST 1963	UFRGST 1963	UFRGST 1963	UFRGST 1963	
<i>A. grupo3</i>	UFRGST 3145	UFRGST 3145	UFRGST 3145	UFRGST 3145	UFRGST 3145	UFRGST 3145		UFRGST 3145
<i>A. grupoE</i>		UFRGST 1132	UFRGST 1132	UFRGST 1132	UFRGST 1132	UFRGST 1132	UFRGST 1132	UFRGST 1132
<i>A. hastata</i>		FJ441678		FJ441921	FJ441861	FJ441738		FJ441798
<i>A. heterozonata</i>	UFRGST 4040	UFRGST 4040	UFRGST 4040		UFRGST 4040		UFRGST 4040	UFRGST 4040
<i>A. ignatiana</i>		FJ441679		FJ441922	FJ441862	FJ441739		FJ441799
<i>A. kingii</i>		UFRGST 1404	UFRGST 1404	UFRGST 1404	UFRGST 1404	UFRGST 1404	UFRGST 1404	UFRGST 1404
<i>A. kraoh</i>		FJ441692		FJ441935	FJ441875	FJ441752		FJ441812
<i>A. leeseri</i>	UFRGS 4172	UFRGS 4172		UFRGS 4172	UFRGS 4172			UFRGS 4172
<i>A. mertensii</i>		FJ441675		FJ441918	FJ441858	FJ441735		FJ441795
<i>A. munoai</i>	UFRGST 3418	UFRGST 3418	UFRGST 3418	UFRGST 3418	UFRGST 3418	UFRGST 3418	UFRGST 3417	UFRGST 3417
<i>A. prunicolor</i>	UFRGST 3241	UFRGST 3241	UFRGST 3241	UFRGST 3241	UFRGST 3241	UFRGST 3241	UFRGST 3241	UFRGST 3241
<i>A. roberti</i>		FJ441711		FJ441954	FJ441894	FJ441771		FJ441831
<i>A. saxosa</i>		FJ441709		FJ441952	FJ441892	FJ441769		FJ441829
<i>A. schmidtii</i>	EU203655	FJ441681	AY605475	AY605475	FJ441864	FJ441741		FJ441801

Espécie	12S	16S	CYTB	ND2	BDNF	CMOS	NT3	RAG
<i>A. silvestrii</i>	UFRGS 4160	UFRGS 4160		UFRGS 4160	UFRGS 4160	UFRGS 4160		UFRGS 4160
<i>A. trachura</i>		UFRGST 0956	UFRGST 0956	UFRGST 0956	UFRGST 0956	UFRGST 0956	UFRGST 0956	UFRGST 0956
<i>A. vermicularis</i>	UFRGS 4161	UFRGS 4161	UFRGS 4161	UFRGS 4161	UFRGS 4161			UFRGS 4161
<i>A. xera</i>	EU203656	EU203656		AY662541		AY662568		AY662619
<i>Geocalamus acutus</i>	AB162909	FJ441724	AB162909	FJ441967	FJ441907	AY444017		FJ441844
<i>Leposternon infraorbitale</i>		FJ441723		FJ441966	FJ441906	FJ441783		FJ441843
<i>L. microcephalum</i>		FJ441718		FJ441961	FJ441901	FJ441778		FJ441838
<i>L. polystegum</i>		FJ441719		FJ441962	FJ441903	FJ441779		FJ441839
<i>Trogonophis wiegmanni</i>	EF545712	FJ441667		FJ441910	FJ441850	AY444025	EU203627	FJ441787

Apêndice 2

Tabela A: Matriz de caracteres morfológicos utilizados nas análises.

Táxon	Caracteres																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<i>Amphisbaena alba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0	1	1,2,3,4	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Amphisbaena anaemariae</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena angustifrons</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1,2	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Amphisbaena bolivica</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1,2	1	1	1	0	0	0	1	0
<i>Amphisbaena caeca</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1,2	1	1	0	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena camura</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1,2	1	1	1	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena cubana</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	?	0	?	?	?
<i>Amphisbaena darwini</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0,1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena fenestrata</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena fuliginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	0	1	2,3,4	1	1	0	0	1	0	0	0
<i>Amphisbaena hastata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	?	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena heterozonata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0,1	1	1	0	0	0	0	1	0
<i>Amphisbaena ignatiana</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2	?	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena leeseri</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena mertensii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1,2,3	1	1	0	0	1	0	0	0
<i>Amphisbaena munoai</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena prunicolor</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena schmidti</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena silvestrii</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena grupo1</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena grupo2</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena grupo3</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena grupo4</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0,1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena grupoE</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0,1	1	1	0	0	0	0	1	1

Táxon	Caracteres																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<i>Amphisbaena trachura</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0,1	1	1	1	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena vermicularis</i>	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	
<i>Amphisbaena xera</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	?	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena kingii</i>	1	1	0	0	1	?	0	?	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
<i>Amphisbaena anomala</i>	2	0	1	0	1	1	0	2	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	2	0	1	1	0
<i>Amphisbaena brasiliana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
<i>Amphisbaena kraoh</i>	0	0	0	0	0	?	0	0	0	2	1	1	0	1	0	1	2	1	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena saxosa</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	?	0	?	?
<i>Amphisbaena cuiabana</i>	0	?	0	0	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	1	0,1	1	2	1	0	0	1	1	1
<i>Amphisbaena roberti</i>	0	?	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	2	1	0	0	1	1	0
<i>Geocalamus acutus</i>	1	1	0	0	1	0	1	?	?	1	0	0	1	?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
<i>Leposternon infraorbitale</i>	2	1	1	1	?	?	1	?	?	1	0	0	0	?	1	0	?	1	1	0	2	0	1	1	1
<i>Leposternon microcephalum</i>	2	1	1	1	?	?	1	?	?	0	0	0	0	?	1	0	?	1	1	0	2	0	1	1	1
<i>Leposternon polystegum</i>	2	1	1	1	?	?	1	?	?	0	1	0	0	?	1	0	?	1	1	0	2	0	1	1	1
<i>Trogonophis wiegmanni</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	?	?	0	0	?	1	?	1	0	0	1	2	1

Táxon	Caracteres																									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Amphisbaena alba</i>	0	0	0	?	0	1	1	?	1	1	1	0	1	?	1	0	0	0	1	2	3	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena anaemariae</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	1	1	1	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena angustifrons</i>	1	0	0	?	2	0	1	?	1	1	1	?	?	?	?	0	?	0	1	2	1	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena bolivica</i>	1	0	0	?	0	1	1	?	1	1	1	?	?	?	?	0	?	0	?	1	?	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena caeca</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena camura</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena cubana</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena darwini</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	1	1	1	0	1	?	1	0	0	0	1	2	1	0	0	0	2	1

Táxon	Caracteres																									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Amphisbaena fenestrata</i>	0	0	0	?	0	0	1	?	1	1	1	0	0	?	0	0	?	0	1	2	?	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena fuliginosa</i>	1	0	2	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	1	0	2	1	
<i>Amphisbaena hastata</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena heterozonata</i>	0	?	0	?	2	1	1	?	1	1	1	?	?	?	?	0	?	0	1	1	1	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena ignatiana</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena leeseri</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena mertensii</i>	0	0	2	?	1	1	1	?	1	1	1	?	?	?	?	0	?	0	1	2	1	0	1	0	2	1
<i>Amphisbaena munoai</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	0	1	1	0	1	?	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1
<i>Amphisbaena prunicolor</i>	1	0	1	?	2	1	1	?	1	1	1	0	1	?	0	0	?	0	1	1	1	0	0	1	2	1
<i>Amphisbaena schmidti</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena silvestrii</i>	0	0	1	?	2	0	1	?	0	1	1	?	?	?	?	0	?	0	?	1	?	0	?	?	?	?
<i>Amphisbaena grupo1</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	0	1	1	0	1	?	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1
<i>Amphisbaena grupo2</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	0	1	1	0	1	?	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1
<i>Amphisbaena grupo3</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	0	1	1	0	1	?	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1
<i>Amphisbaena grupo4</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	1	1	1	0	1	?	1	0	0	0	1	2	1	0	0	0	2	1
<i>Amphisbaena grupoE</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	1	1	1	0	1	?	0	0	0	0	1	2	2	0	2	1	2	1
<i>Amphisbaena trachura</i>	0	0	1	?	2	1	1	?	1	1	1	0	0	?	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	2	1
<i>Amphisbaena vermicularis</i>	0	?	0	?	0	1	1	?	0	1	1	?	?	?	?	0	?	0	1	1	1	0	1	0	?	1
<i>Amphisbaena xera</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena kingii</i>	1	0	0	?	0	1	1	?	1	0	1	1	1	?	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
<i>Amphisbaena anomala</i>	0	0	0	?	0	1	1	?	1	0	1	1	1	?	0	1	?	0	1	1	1	1	1	0	0	1
<i>Amphisbaena brasiliانا</i>	1	0	0	?	0	0	1	?	1	0	1	0	1	?	1	0	?	0	1	2	2	0	1	1	1	1
<i>Amphisbaena kraoh</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena saxosa</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Amphisbaena cuiabana</i>	0	0	0	?	0	1	1	?	1	0	1	1	1	?	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Amphisbaena roberti</i>	1	0	0	?	0	0	1	?	1	0	1	0	1	?	0	0	?	0	1	1	1	0	1	0	2	1
<i>Geocalamus acutus</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1

Táxon	Caracteres																									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Leposternon infraorbitale</i>	0	1	0	?	0	0	0	?	0	0	1	1	0	?	0	1	?	0	1	1	0	1	0	0	2	1
<i>Leposternon microcephalum</i>	0	1	0	?	0	0	0	?	0	0	1	1	1	?	0	1	0	0	1	1	0	1	2	0	2	1
<i>Leposternon polystegum</i>	0	1	0	?	0	0	0	?	0	0	1	1	1	?	0	1	?	0	1	1	0	1	0	0	2	1
<i>Trogonophis wiegmanni</i>	1	1	1	0	0	?	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	2	1	1	1	0	0

Apêndice 3

Material examinado

Amphisbaena grupo1 (N=26)

UFRGS 4896, 5037, 5039–5041, 5297–5299, 5366–5368, 5370 (holótipo), 5371, 5999, 5692, 5694–5697, 5842–5844, 5849–5851.

Amphisbaena grupo2 (N=16)

MCP 15118, 15351, 15788, 16787; UFRGS 5511–5513, 5614, 5616, 5704, 5705, 5706 (holótipo), 6125, 6248, 6485, 6486.

Amphisbaena grupo3 (N=9)

UFRGS 5892, 5893 (holótipo), 5894, 5967–5968; CHUFSC 668, 683, 696, 856.

Amphisbaena grupoE (N=25)

CHUFSC 711; MCN 2655, 2666, 2670–71, 6216–20, 6222, 6224, 7310, 15461; UFRGS 4684, 5292 (holótipo), 5285; MCP 299, 4104, 6660, 7009.

Amphisbaena alba (N=17)

MHNCI 5798, 6018, 12210; MNRJ 1758, 1764, 1769, 2079, 2100, 7206, 9306, 14905, 15287, 15759, 19139, 19315, 19896, 19800

Amphisbaena anaemariae (N=10)

MNRJ 7095, 7213, 7312; CHUNB 33961, 33965, 39076, 40758, 50876, 62055–62056

Amphisbaena anomala (N=1)

MNRJ 16108

Amphisbaena darwini (N=59)

MCP 6622, 11413; UFRGS 5005–06, 5052–5054, 5070, 5091, 5170, 5216, 5434, 5944; MNHN 205, 212, 214, 779, 895, 898, 901, 1096–1097, 1622, 2364, 2747, 3027–3028, 3030–3037, 3039–3040, 3104–05, 3112 (lectótipo), 3107 (lectoparátipo), 3113 (lectoparátipo), 5689, 5759, 5836, 5944, 5971–73, 5975; ZVC-R 1973, 2053, 2070–72, 2411–2412, 3746, 3950, 3957, 3963–3964, 4423, 4480, 4975.

Amphisbaena fuliginosa (N=2)

MNRJ 13172, 15012

***Amphisbaena heterozonata* (N=36)**

MACN 3761–62, 3831, 7795, 11771, 24834–35, 25128, 25265–67, 25283 (neótipo), 25284, 25815, 31391–92, 32897, 32903, 33148–49, 33462, 36197, 36635–37, 36640, 37148–51, 40057, 40265 17861, 17890.

***Amphisbaena leseri* (N=1)**

CHUNB 18376

***Amphisbaena mertensii* (N=30)**

MHNCI 445,1395, 1808, 2103, 2592, 2785, 2788, 2935, 2944, 3090, 3645, 4106, 4754, 5009, 5952, 7358, 8095, 9296, 9299, 9612, 10194, 10276, 11192–11194, 11746–11747; MNRJ 7219, 18272, 18540.

***Amphisbaena munoai* (N=70)**

UFRGS 5684, 5943, 6007–6011, 6013–6015, 7408–7413; MCP 11790, 12006, 13316–18, 14572–74, 14576, 14865; ZVC-R 308, 1511, 1532, 2417, 3798, 3802, 3835, 3840, 3878, 4101, 4356; MNHN 587 (holótipo), 933–34, 1100–01, 1437–38, 1619, 1651, 3067, 3069–70, 3074, 3076–3078, 3080, 3088–89, 3095–101, 3161, 3169, 5666, 5699, 5974, 6144; MNRJ 3307 (parátipo)

***Amphisbaena nigricauda* (N=1)**

MNRJ 18166

***Amphisbaena prunicolor* (N=135)**

ANSP 12969 (holótipo); MHNCI 2376, 4076, 4090, 5163, 5944, 8494, 8644, 8647–48, 8560–8561, 8564, 10079, 10084, 10098, 10732, 11912–11913, 12536; MCP 963, 332–333, 341–342, 1456, 1544, 1551, 2875, 2905, 3080–3081, 3616–3617, 4316, 4336, 4783–4784, 4786–4787, 4837–4839, 5379–5382, 5384, 5386–5387, 5434, 5929, 6095, 8448, 10903–10905, 10907–10908, 12543, 13800, 15071–15072; UFRGS 195, 1942–1944, 1980, 2322, 2366, 4536, 4671, 4719, 4856, 5280–5281, 5305, 5317–5318, 5322, 6247, 6481; MCN 2422, 2649, 2715–2721, 2777, 3130, 3132–3133, 3135, 3592, 4283–4284, 4357, 4467, 6125, 6529, 6594, 7644, 8910–8912, 9005, 9778, 15284–15285, 16337; CHUFSC 604–608, 731, 750, 943–945, 1116–1117, 1198, 1222.

***Amphisbaena trachura* (N=74)**

MACN 3760, 17839, 21273–75; MCP 292, 299, 329, 334, 1700, 2844, 3331–32, 4104, 4310, 4377, 4637, 5594, 5764, 6119, 6195, 6660, 6947, 7009, 7594, 7859, 8588, 10568, 11737, 11545, 11708, 12003, 12199, 12498, 13581, 14384, 18041, 18517, 18598; UFRGS 145, 1948, 1953, 1960, 1968, 2087, 2252, 3656, 4011, 4160, 4572, 4677, 4684, 4688, 4700, 4880, 4897, 4928–29, 4939, 4971, 4978, 5084, 5117, 5232, 5258–59, 5381, 5391, 5393, 5528, 5595, 5665, 5712, 5762, 6149, 6232; MCN 2655, 2666, 2670–71, 4683, 5941–42, 6216–20, 6222, 6224, 7310, 7384, 15461; ANSP 12988 (holótipo); CHUFSC 711, 1052; MHNCI 10, 337–38, 340, 1147, 2548, 2740, 2963, 3144, 3299, 3479–80, 4094, 4129, 4441, 4558, 5786, 5805, 6179, 6632, 6986, 7390, 7392–93, 7789, 7791, 10064, 10065, 10108, 10331, 11512, 11532, 11869–72; MNHN 172, 860, 905, 3042–43, 20607.

***Amphisbaena vermicularis* (N=12)**

MNRJ 2086, 2091, 7217, 7439, 1777, 14861, 17805, 18491, 19758; CHUNB 26490, 35349, 52367

***Amphisbaena kingii* (N=5)**

UFRGS 5394, 5510, 6085, 5410, 5408.

***Leposternon microcephalum* (N=3)**

MNRJ 4026, 15843, 15846

Considerações finais

Nossos resultados mostraram a existência de uma diversidade maior que a conhecida entre as espécies de Amphisbaenidae da região sul do Brasil, Uruguai e Argentina, aumentando para nove as espécies do grupo de *Amphisbaena darwinii* reconhecidas na região. Além disso, reforçam que as revisões taxonômicas detalhadas são essenciais para a delimitação destas espécies de difícil identificação e que apresentam históricos taxonômicos complexos. O uso de amostras moleculares possibilitou a identificação de diferentes linhagens entre esses táxons, reiterando a necessidade da integração de diferentes linhas de evidências para a delimitação de espécies. O conhecimento da variação morfológica e molecular para as espécies do grupo foi ampliado, no entanto, alguns táxons necessitam de uma melhor amostragem (principalmente molecular) para avaliação.

Nossos resultados, sugerem que as espécies tradicionalmente associadas à *Amphisbaena darwinii* representam um agrupamento natural monofilético. No entanto, o posicionamento de algumas espécies não incluídas no presente estudo (*Amphisbaena albocingulata*, *A. hogei* e *A. nigricauda*) ainda é incerto, sendo necessária a inclusão de suas amostras. Além disso, demonstram a existência de diferentes linhagens em *Amphisbaena* que poderiam ser elevadas à categoria de gênero. A nomenclatura atual, que reconhece os gêneros *Amphisbaena* (incluindo *Anops*, *Aulura*, *Bronia* e *Cercolophia*) e *Leposternon*, é um arranjo artificial que torna *Amphisbaena* parafilético. Portanto, estudos com a inclusão de uma diversidade mais representativa de Amphisbaenidae são necessários para a tomada de decisões quanto às considerações taxonômicas, em níveis genéricos do grupo.