Lorena Corina Bezerra de Lima

Filogenia e delimitação de espécies no complexo *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae) utilizando marcadores moleculares

Phylogeny and species delimitation in the *Boa constrictor* complex (Serpentes, Boidae) using molecular markers

São Paulo

2016

Lorena Corina Bezerra de Lima

Filogenia e delimitação de espécies no complexo *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae) utilizando marcadores moleculares

Phylogeny and species delimitation in the *Boa constrictor* complex (Serpentes, Boidae) using molecular markers

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração : Biologia/Genética

Orientador (a): Dra. Maria José de J.Silva
Co-orientador: Dr. Paulo Passos

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Bezerra de Lima, Lorena Corina
Filogenia e Delimitação de Espécies no complexo *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae) utilizando marcadores moleculares
122 pg

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Boa constrictor* 2. Filogenia 3. Delimitação de espécies
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).

_____
Prof. Dr(a). Maria José de J. Silva
Orientador(a)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Sistemática molecular e filogeografia do complexo *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae)", **protocolo nº 1148/13**, sob a responsabilidade de Maria José de Jesus Silva e Lorena Corina Bezerra de Lima – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/03/2014.

Vigência do Projeto: 03/2014 - 08/2016	**N° de animais/espécie**
Laboratório Especial de Ecologia e Evolução	200 animais de espécies silvestres brasileiras adul (serpente *Boa constrictor*)- 40kg (máx) (M,F)

São Paulo, 24 de março de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedicatória

Para minha avó Lourdes,

a pessoa mais sábia que conheci.

Epígrafe

... Porque a direção é mais importante que a velocidade...

Poema: Mude, autor: Edson Marques

Agradecimentos

... E aprendi que se depende sempre

De tanta muita diferente gente

Toda pessoa sempre é as marcas

Das lições diárias de outras tantas pessoas

E é tão bonito quando a gente entende

Que a gente é tanta gente

Onde quer que a gente vá

E é tão bonito quando a gente sente

Que nunca está sozinho

Por mais que a gente pense estar...

Gonzaguinha

Durante estes últimos anos, adquiri muito conhecimento profissional e (mais ainda!) pessoal. E aprender... DÓI. Exige desconstrução. Exige mudança. Aprendi a mudar: de cidade, de emprego, de casa, de opinião, de vida... Aprendi a ouvir mais que falar. Aprendi a tentar, várias vezes e de várias formas. E a abrir mão... Talvez, quem sabe, até aprendi a ser um pouco (muito pouco) menos teimosa.

Ainda bem que no meio desse caminho a vida nos coloca ao lado de outros tantos seres incríveis que tornam o processo menos doloroso e mais divertido... E nisso eu tive sorte! MUITA SORTE!

Gostaria de expressar nas próximas linhas meu profundo agradecimento a todos aqueles que tiveram papel importante na construção deste trabalho. E se por acaso, em algum momento, alguém me ajudou e o nome não está citado, por favor, peço que me desculpe.

Inicialmente gostaria de agradecer a Dra. Maria José de Jesus Silva, por ter aberto a porta do seu laboratório e ter me proporcionado a oportunidade do conhecimento e por quem nutro um profundo respeito. Muito obrigada principalmente por não se conformar com pouco e por exigir que eu seja melhor a cada dia. De coração, agradeço...

Ao meu co-orientador Paulo Passos, pela ajuda na obtenção e identificação de amostras e também pelas conversas sempre muito valiosas;

A toda a equipe do laboratório que trabalhou escravamente para que as tabelas, árvores, mapas e estruturas psicodélicas afins ficassem bons: Léo Koba, Camilla, Cris, Mari e Karina. A gente sofre mas a gente se diverte! Devo muitos cafés a vocês...

Também gostaria de agradecer à Nancy, ao Léo, Nicholas, Silara e Lucas pelos momentos de descontração;

Aos amigos que fiz ao longo desses anos na USP e que vieram ao meu socorro nas horas de desespero analítico: Mariane Targino, Rachel Montesinos, Annelise Frazão e Valesca Anschau. Muito obrigada pela ajuda nas análises, leitura do manuscrito e correções e muito obrigada mais ainda pela amizade !!!

E por falar em amigos...

Quantos eu fiz nessa cidade!

Fernanda, minha flor, você que tão amorosamente me acolheu desde as minhas primeiras visitas ao laboratório e que tenho o privilégio de poder chamar de amiga;

Minha “mimi” Tais, que sempre muito pacientemente me ajudou, me ensinou a andar pelo mundo da molecular e que trabalhou muito estes dias para que eu não caísse do cavalo. A você, amizade e respeito;

E aos amigos da vida: Lílian, André, Will, Carmem, Luana...

Gostaria de agradecer aos membros da banca examinadora por aceitar contribuir com este trabalho;

Às instituições que gentilmente cederam amostras: Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil); Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (Brasília, Brasil); Coleção Herpetológica do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da UFRN (Natal, Rio Grande do Norte, Brasil); Centro de Ornitologia e Biodiversidad (Lima, Peru); Faculdades Integradas do Tapajós (Santarém, PA, Brasil); Museu Biológico do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil); Museu Nacional (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, PA, Brasil); Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del *Ecuador*; Universidade de Medicina Veterinária (Viena, Áustria), Criadouro Jibóias Brasil.

À CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro PROEX;

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo;

Ao Instituto Butantan pela infraestrutura;

Pesquisadores e funcionários do Centro de Biotecnologia, pelo uso do sequenciador;

Aos maravilhos e eficientes funcionários da secretaria da pós, sempre prontos a descascar nossos pepinos.

E claro, gostaria de agradecer a minha maravilhosa família: daqui e de lá de acolá.... Tantos cantos no Brasil para onde posso ir... Saber que se é amado é sempre um alento e nos dá forças para seguir em frente...

E por falar em amor...

Das surpresas que a vida traz.... Assim... Malandramente... A vida me trouxe até o José. E você me trouxe mudança. E tive que me reinventar, tive que aprender a me doar e tive também, que aprender a receber... E você não tem sido um companheiro... Você tem sido “O companheiro”: o amigo para as conversas bobas e sem nexo, o dono da casa, o psicólogo, o namorado.... Obrigada pelo sorriso largo de todas as manhãs... Obrigada por me fazer tão feliz....

A todos aqueles que sabem o quão difícil é trabalhar com ciência em nosso país...

E por último, agradeço às serpentes, esses seres tão maravilhosos e tão incompreendidos...

Índice

1 INTRODUÇÃO 10
1.1 Biologia de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 10
1.2 Histórico Taxonômico 10
1.3 Sistemática molecular do gênero *Boa* 13
1.4 Relações internas em *Boa constrictor* 14
1.5 Registro fóssil 16
1.6 Sobre conceitos de espécie 18
1.7 Delimitação de espécies 19
2 OBJETIVOS 27
3 MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 Material 27
3.1.2 Esclarecimentos sobre amostras 28
3.2 Métodos 40
3.2.1 Extração de DNA 40
3.2.2 Amplificação de fragmentos dos genes de interesse 40
3.2.3 Análise e edição das sequências 43
3.2.4 Construção das matrizes 43
3.2.5 Análises Filogenéticas 44
3.2.6 Análise de Delimitação de Espécies (ADE) 45
3.2.7 Estimativa dos Tempos de Divergência 46
4 RESULTADOS 48
4.1 Análises Filogenéticas 48
4.2 Análises de Delimitação de Espécie 53
4.2.1 bPTP 53
4.2.2 GMYC 56
4.3 Análise de Tempos de Divergência 56
5 DISCUSSÃO 73
5.1 Análises Filogenéticas 73
5.1.1 Grupos recuperados 73
5.1.2 Relações entre as subespécies 76
5.1.3 Fatores responsáveis por gerar incongruências nas análises filogenéticas 79
5.2 Análise de Delimitação de Espécie (ADE) 81

5.3 Relação entre Filogenia, Análise de Delimitação de Espécies (ADE) e Implicações taxonômicas 82
5.4 Tempos de Divergência 84
5.5 Hipóteses Biogeográficas 85
6 CONCLUSÕES 91
7 RESUMO 92
8 ABSTRACT 93
10 ANEXOS 103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758

As serpentes do gênero monotípico *Boa* pertencem a família Boidae juntamente com outros quatro gêneros: *Chilabothrus, Corallus, Epicrates* e *Eunectes* (Reynolds *et al*., 2013).

A espécie *Boa constrictor* está amplamente distribuída por toda a região Neotropical, desde o México até a Argentina, ocupando também várias ilhas, tanto continentais (ex.: Ilha de Marajó, Trindade e Tobago), como oceânicas (ex.: Ilha Saboga, Santa Lucia e Dominica) (Figura 1). Não possuem restrição de hábitat, ocupando domínios morfoclimáticos diversos, como florestas tropicais, campos abertos, regiões pantanosas e semiáridas; distribuindo-se ao longo de um intervalo de 66 graus de latitude, com registro máximo de altitude de 1.500 metros (Henderson *et al.,* 1995; Boback, 2005; Henderson e Powel, 2007).

São animais constritores dotados de forte musculatura, apresentando médio a grande porte, geralmente com dois a três metros de comprimento, podendo atingir até mais de quatro metros (Pizzatto, 2006; Reed e Rodda, 2009), embora sejam relatadando casos de nanismo nos indivíduos de ilhas (Green, 2011; Wright, 2012). Generalistas, podem alimentar-se de aves (Boback, 2005; Begotti e Filho, 2012; Rocha-Santos *et al*., 2014), anfíbios (Pizzatto *et al*., 2009), mamíferos (Ferrari *et al*., 2004; Cisneros-Heredia *et al*., 2005; Sorrell *et al*., 2011, Teixeira *et al*., 2016) e répteis (Quick *et al*., 2005);

Estas serpentes reproduzem-se por viviparidade (Wagner, 2006) e de maneira geral, as fêmeas são maiores que os machos, mas estes possuem cauda mais longa (Chiaraviglio *et al*., 2003; Boback, 2006; Wright, 2012).

1.2 Histórico Taxonômico

Entre os boideos, apenas *Boa* é considerado monotípico, composto apenas da espécie *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (McDiarmid *et al*., 1999; Vences e Glow, 2003; Burbrink, 2005; Lanza e Nistri, 2005; Henderson e Powell, 2007; Pyron *et al*., 2013, 2014).

Boa constrictor apresenta considerável variação nos padrões de coloração (Henderson e Hedges, 1995), os quais têm sido historicamente utilizados

no reconhecimento de várias subespécies. O fenômeno de policromatismo, somado à grande sobreposição em dados merísticos e morfométricos tornam o reconhecimento dessas subespécies problemático. A Tabela 1, retirada e traduzida de Bonny (2007), mostra o histórico taxonômico do gênero, com várias descrições, redescrições e sinonimizações.

Os caracteres morfométricos mais frequentemente utilizados para descrição das subespécies em *Boa constrictor* são obtidos a partir da contagem do número de escamas dorsais, ventrais, subcaudais, oculares, supralabiais, infralabiais e relativos ao número e tamanho das manchas dorsais (Daudin, 1803; Cope, 1877; Forcart, 1951; Cochran, 1946; Lazell, 1964).

Dado que cada autor utilizou diferentes critérios para o reconhecimento dos diferentes táxons, as subespécies previamente propostas apresentam diversos graus de aceitação pela comunidade científica (Peters, 1970; Langhammer, 1985; Price e Russo, 1991; McDiarmid *et al.,* 1999; Wallach *et al.*, 2014), de modo que alguns autores não reconhecem os táxons propostos na categoria subespecífica (Card *et al*, 2016; Wilson e Meyer, 1985), enquanto Price e Russo (1991) não consideram o gênero monotípico, argumentando que ao menos as subespécies insulares representam espécies distintas.

Kluge (1991) realizou uma análise cladística (com base em máxima parcimônia) baseada em 79 caracteres morfológicos, na qual recuperou as espécies dos gêneros de boíneos presentes em Madagascar (*Sanzinia madagascariensis, Acrantophis madagascariensis* e *A. dumerili*) como grupo irmão de *Boa constrictor*, sugerindo que tais gêneros deveriam ser alocados em *Boa.* O clado formado por *Boa, Sanzinia* e *Acrantophis* seria, então, aparentado a *Corallus*, *Epicrates* e *Eunectes* (Boinae do novo mundo).

Mais de uma década depois, no estudo monográfico mais completo disponível para o gênero, desenvolvido por Bonny (2007), foram reconhecidas 10 subespécies de *B. constrictor*. Seis subespécies estão agregadas sob a denominação de grupo Imperator: *Boa constrictor imperator* Daudin, 1803; *Boa constrictor sigma* Smith, 1943; *Boa constrictor sabogae* Barbour, 1906; *Boa constrictor longicauda* Price & Russo, 1991; *Boa constrictor eques* Eydoux & Souleyet, 1841 e *Boa constrictor ortonii* Cope, 1878. Um segundo grupo, denominado Constrictor, reúne as subespécies *Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758; *Boa constrictor amarali* Stull, 1932 e *Boa constrictor melanogaster*

Langhammer, 1983. Além destas, o autor reconhece a subespécie *Boa constrictor occidentalis* Philippi, 1873 e considera *Boa nebulosa* e *Boa orophias* como espécies plenas. Contudo, este estudo não apresenta uma metodologia clara e mesmo replicável, fazendo com que os resultados obtidos pelo autor e sua proposta taxonômica sejam contestados pelos autores subsequentes (*e.g.*, Wallach *et al*., 2014).

Santoyo-Brito (2007) estudou a morfologia externa de 91 exemplares de três subespécies descritas para o território mexicano: *B. c. imperator* Daudin, 1803; *B. c. mexicana* Jan, 1863; e *B. c. sigma* Smith,1943; baseado apenas em amostras mexicanas. O autor realizou a recontagem de dois caracteres morfológicos (número das escamas ventrais e dorsais no meio do corpo), que foram utilizados para descrever estas subespécies em trabalhos anteriores. Além disso, foram realizadas contagem de mais nove caracteres merísticos e das manchas posterolaterais presentes na cabeça, manchas presentes no dorso e lateral do corpo, presença ou ausências de manchas no focinho e região dorsal do olho. O autor agrupou estes exemplares em seis diferentes zonas (com base nos locais de procedência): Norte, Golfo, península de Yucatán, Pacífico, Ilhas Maria e Central, porém verificou que os caracteres morfológicos analisados foram similares em todos os exemplares e não permitiram segregar as referidas populações com base em combinações únicas de caracteres, concluindo não haver diferenças significativas entre as subespécies *B. c. sigma*, *B. c. mexicana* e *B. c. imperator*.

Uetz (2016), por compilação dos dados da literatura, reconheceu duas espécies : *Boa imperator* e *Boa constrictor*, está última com seis subespécies: *Boa c. amarali* Stull, 1932; *Boa c. constrictor* Linnaeus, 1758; *Boa c. nebulosa* Lazzel, 1964; *Boa c. occidentalis* Philippi, 1873; *Boa c. orophias* Linnaeus, 1758 e *Boa c. ortonii* Cope, 1877.

Uma vez que nenhum estudo de revisão taxonômica (com ampla amostragem e cuja metodologia possa ser replicável) foi realizado até o momento em *Boa*, este trabalho adotou a abordagem mais tradicional e considerou o gênero como monotípico, considerando as seguintes subespécies: *B. c. amarali* Stull, 1932; *B. c. constrictor* Linnaeus, 1758; *B. c. eques* Eydoux e Souleyet, 1842; *B. c. imperator* Daudin, 1803; *B. c. longicauda* Price e Russo, 1991; *B. c. melanogaster* Langhammer, 1983; *B. c. nebulosa* Lazell, 1964; *B. c. occidentalis* Philippi, 1873; *B. c. orophias* Linnaeus, 1758; *B. c. ortonii* Cope, 1878; *B. c. sabogae* Barbour, 1906 e

B. c. sigma Smith, 1943. No Brasil, até o momento, foram descritas as subespécies *B. c. constrictor* com ocorrência na Floresta Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, e *B. c. amarali* no Cerrado (Peters *et al*., 1986; Henderson e Powell, 2007; Costa e Bérnils, 2015).

1.3 Sistemática molecular do gênero *Boa*

A visão conceitual do que se considera uma espécie mudou ao longo do tempo, bem como as metodologias empregadas para reconhecer os grupos taxonômicos. A emergência das técnicas moleculares, permitiu a publicação de uma série de trabalhos empregando metodologias embasadas em dados de sequências de DNA, com o objetivo de revisitar as propostas taxonômicas e esta abordagem também tem ocorrido no gênero Boa.

Heise *et al.* (1995) realizaram o primeiro estudo utilizando marcadores moleculares para *Boa constrictor.* Os autores investigaram as relações dentro da ordem Squamata, composta pelas serpentes fossoriais (Scolecophidia), boídeos (Henophidia) e demais serpentes (Caenophidia), tuataras e lagartos, usando sequências dos genes mitocondriais para as subunidades 16S e 12S de RNA ribossomal. Henophidia (e Boidea) não foi recuperado como um grupo monofilético, pois *Boa* foi recuperado fora deste agrupamento, como o grupo irmão de Caenophidia.

Posteriormente, vários autores realizaram análises utilizando marcadores moleculares, a fim de testar a hipótese proposta por Kluge (1991) de que *Sanzinia* e *Acrantophis* pertenciam ao gênero *Boa*. Vences *et al*. (2001) desenvolveram análises empregando sequências de genes para as subunidades 16S e 12S do RNA ribossomal; Burbrink (2005) utilizou dados morfológicos associados a sequências do gene para o city *b* e Noonan e Chippindale (2006a) fizeram uso de cinco genes nucleares: c-*mos* (gene para o fator de maturação do oócito), NFT3 (neurotrofina 3), BNDF (fator precursor neurotrófico derivado do cérebro), RAG1 (gene ativador da recombinação 1) e ODC (ornitina descarboxilase). Esses estudos refutaram a hipótese de Kluge (1991) de que os representantes de Madagascar pertencessem ao gênero *Boa* e recuperaram *Boa* como grupo irmão dos demais gêneros de boíneos do novo mundo (*Corallus, Epicrates* e *Eunectes*).

Lynch e Wagner (2010), Pyron *et al*. (2013, 2014) e Reynolds *et al*. (2013) realizaram análises empregando um número maior de marcadores moleculares e de representantes dos boídeos, as quais também refutaram a hipótese proposta por Kluge (1991) e corroboraram a hipótese de Vences *et al*. (2001), Burbrink (2005) e Noonan e Chippindale (2006), na qual *Boa* é grupo irmão dos demais gêneros de boíneos Neotropicais.

1.4 Relações internas em *Boa constrictor*

O *status* monotípico de *Boa* manteve-se estável ao longo do século XX e início do século XXI, mesmo com a inclusão de dados moleculares e outros terminais para os boídeos. Entretanto, este panorama foi modificado quando as relações internas começaram a ser investigadas.

Para as intrarelações em *Boa*, o primeiro estudo publicado foi realizado por Hynková *et al.* (2009), no qual foram utilizadas sequências do gene mitocondrial citocromo *b* (1114 pares de bases - pb) de 115 amostras de populações de *Boa constrictor,* compreendendo seis subespécies: *B. c. constrictor, B. c. imperator, B. c. longicauda, B. c. sabogae, B. c. amarali* e *B. c. occidentalis*, inclusive alguns exemplares que, hipoteticamente, seriam “híbridos” resultantes do cruzamento de diferentes subespécies (*B. c. constrictor* X *B. c*. *imperator*). As análises recuperaram dois clados distintos (em 67 haplótipos): um na América Central e outro na América do Sul (Figura 1), com uma divergência genética estimada de 5 a 7% entre os dois grupos. De acordo com as análises, também haveria trocas genéticas em áreas limítrofes onde representantes dos dois clados teriam contato entre as populações mais ao norte da América do Sul, no Peru (subespécies *B. c. longicauda* e *B. c. ortonii*), Equador (subespécie *B. c. melanogaster*), Colômbia e Venezuela.

Hynková *et al.* (2009) sugeriram que *B. c. imperator* fosse elevada à categoria de espécie plena, mas não formalizaram essa mudança. Os autores reuniram sob a denominação de *B. c. imperator* (*sensu lato*) todas as populações do clado da América Central, incluindo *B. c. longicauda* e *B. c. sabogae.* Também destacaram *B. c. occidentalis* como o haplótipo mais distinto dentro do clado da América do Sul, sendo grupo irmão das outras subespécies neste clado, mas enfatizaram que esta ainda deve ser considerada como subespécie. E, ainda de

acordo com os autores não houve suporte molecular para distinguir as amostras de *B. c. amarali* dentro do clado Sul-Americano.

Reynolds *et al*. (2013) realizaram um amplo estudo utilizando serpentes das famílias Boidae e Pythonidae, compilando um conjunto de dados que abrangeu 127 táxons e 11 lócus, totalizando até 7561 pb por táxon. Os autores recuperaram *B. c. occidentalis* como grupo irmão de *B. c. amarali* + *B. c. constrictor,* e *B. c. imperator* irmão de *Boa imperator sabogae* (assim referida no trabalho). Os autores afirmaram encontrar elevados suportes (85 em *bootstrap* e 89 inferência Baeysiana) para o reconhecimento de *B. imperator*, como proposto por Hynková *et al*. (2009), e recomendaram a elevação de *B. imperator* para a categoria específica, embora tenham admitido a necessidade de um estudo filogenético mais amplo em toda a distribuição de *B. constrictor sensu lato*.

Suárez-Atilano *et al*. (2014) empregaram sequências de citocromo *b* (1063 pb), do íntron nuclear da ornitina descarboxilase (610 pb) e 10 lócus de microssatélites (desenhados pelos próprios autores) para inferir a estrutura filogeográfica, tempos de divergência e demografia histórica de 149 indivíduos de *B. c. imperator* da América Central e México. As análises recuperaram a dicotomia entre as amostras da América Central/México (Norte) e da América do Sul (Sul) e *B. c. occidentalis* como grupo irmão das demais subespécies do clado Sul, corroborando os resultados de Hynková *et al*. (2009).

Adicionalmente, Suárez-Atilano *et al*. (2014) encontraram a presença de duas linhagens reciprocamente monofiléticas em *B. c. imperator*, associadas às principais barreiras geográficas encontradas na América Central e México, às quais denominaram, respectivamente, de PAC (*Mexican Pacific Coast*) e GYCA (*Gulf of Mexico–Yucatan Peninsula–Central America*), além de cinco agrupamentos genéticos diferenciados geograficamente (Figura 2). Segundo os autores, estas duas linhagens de *B. c. imperator* possuem 4% de divergência genética entre si e estão de acordo com os critérios genéticos estabelecidos por Moritz (1994) para o reconhecimento de unidades evolutivamente significativas (ESUs) e que, por isso, consideram PAC e GYCA como ESUs. Os autores ressaltam ainda que, embora *B. c. imperator* seja reconhecida tradicionalmente em todo o México e América Central como uma subespécie, os resultados obtidos (duas grandes linhagens, uma região de contato secundário) fornecem evidências de que podem ser consideradas como

duas espécies distintas, sob o conceito de linhagem geral de espécie proposto por De Queiroz (2007).

Card *et al*. (2016), ampliando amostragem e o número de marcadores moleculares, analisaram as relações filogenéticas e estruturação genética em *Boa* com ampla amostragem de populações do México, América Central e algumas amostras da América do Sul. Foram empregadas sequências mitocondriais para o citocromo *b* (1059 pb) e 1686 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) para um total de 305 indivíduos. Os autores utilizaram uma combinação de métodos de inferência filogenética, análises populacionais e de delimitação de espécies. As diferentes análises suportaram a existência de três clados principais: Norte, Centro e Sul do Continente Americano (Figura 3) e corroboraram os dados descritos por Hynková *et al*. (2009), Reynolds *et al*. (2013) e Suárez-Atilano *et al*. (2014), sugerindo a elevação de *B. c. imperator* à espécie plena e recuperando *B. c. occidentalis* como o grupo irmão de todas as outras amostras do clado Sul (indivíduos do Peru, Brasil, Guiana e Suriname). Além disso, os autores propuseram o reconhecimento de *Boa sigma* como espécie distinta de *B. imperator*, onde a primeira corresponderia ao clado da América do Norte dentro do clado norte composto por *B. imperator* (Card *et al*., 2016).

Embora muitos trabalhos tenham sido publicados para investigar a filogenia e estrutura populacional em *Boa constrictor* (Hynková *et al*., 2009; Reynolds *et al*.; 2013; Suárez-Atilano *et al*., 2014; Card *et al*., 2016), a maioria tem foco nas populações/indivíduos da América Central e México, com poucos indivíduos da porção sul do continente.

Assim, a compilação das informações acerca da grande variabilidade fenotípica (sobretudo com respeito aos padrões de coloração), identificações dúbias, ampla distribuição e propostas filogenéticas baseadas em caracteres moleculares que se complementam e indicam a existência de linhagens distintas dentro de *Boa*, faz deste grupo de serpentes excelente modelo de investigações filogenéticas.

1.5 Registro fóssil

A família Boidae possui registro fossilífero que data do Cretáceo superior, com descrições para todos os continentes, exceto Antártida (Rage, 2001; 2013). A maioria dos fósseis para Boidae, assim como para as serpentes em geral,

são representados por vértebras pré-cloacais isoladas ou associadas (Hsiou e Albino, 2009; Albino, 2012; Scanferla e Agnolín, 2015; Head, 2015).

O fóssil de boídeo mais antigo descrito até o momento para a fauna Neotropical é de *Titanoboa cerrejonensis*, da Formação Cerrejon (Colômbia), com idade estimada entre 60 – 58 Ma (Head *et al*., 2009). Embora Head e colaboradores (2009) não tenham fornecido uma hipótese de relacionamento para *Titanoboa* dentro de Boinae, devido às similaridades morfológicas de elementos craniais (base do forâmem paracotilar e margem anterior do zigósfeno convexa), esta espécie foi considerada como estando na base da radição de Boinae (Head *et al*., 2013).

A hipótese biogeográfica vigente para Boinae propõe que a origem de *Boa* ocorreu provavelmente na parte sul do continente americano (Burbrink, 2005; Noonan e Chippindale, 2006 a, b). De fato, a maioria das descrições fósseis de *Boa* provêm da América do Sul (Albino, 1993; Albino e Carlini, 2008). O fóssil mais antigo de *Boa* descrito até o momento é da região de Gran Barranca (Argentina), descrito por Albino (1993), do início Eoceno (sem especificação da idade), identificado como *Boa* sp.

Para a América Central, há somente um registro, descrito por Head *et al*. (2012), para a Formação Las Cascadas (Panamá), do início do Mioceno, com idade estimada entre 19.3 – 9.8 Ma.

Para a América do Norte, há uma descrição feita para o condado de Gilchrist (Flórida), cuja idade do fóssil também data do início do Mioceno, em torno de 18.5 Ma. Este fóssil foi inicialmente descrito por Vanzolini (1952) como *Neurodromicus stanolseni* e *Neurodromicus barbouri*, sendo em seguida revisados por Auffenberg (1963) e nomeados como *Pseudoepicrates stanolseni*. Posteriormente, Kluge (1988) em uma reanálise, considerou indistinguíveis as vértebras de *Pseudoepicrates stanolseni* e *Boa constrictor*, e a tratou como sinônimo júnior de *B. constrictor*, e Albino (2011) sinonimizou *Pseudoepicrates stanolseni* a *Boa constrictor.*

Uma outra descrição de fóssil para *Boa* foi feita por Miller (1980), considerada na época como gênero *Constrictor*, para Las Tunas, Baja Califórnia, datando do Plioceno tardio (2.5 – 3.5 Ma).

A descrição fóssil mais recente para *B. constrictor* foi realizada por Onary-Alves *et al*. (2016), para o estado de Monary, El Breal de Orocual

(Venezuela), do Plio-Pleistoceno (5.3 – 0.01 Ma) e representa o registro mais ao norte da América do Sul que se tem, como descrição inequívoca de *B. constrictor*.

1.6 Sobre conceitos de espécie

No processo de delimitação de espécies, inevitavelmente incorre-se na questão relativa a definição de espécie. Embora este tópico do estudo não esteja focado em contemplar e/ou avaliar os conceitos de espécies já propostos na literatura, faz-se necessária uma abordagem sucinta do tema de modo a pontuar qual o conceito de espécie será empregado no decorrer do presente estudo (uma revisão mais detalhada pode ser encontrada em Mayden, 1997, 1999; De Queiroz, 1998; Hausdorf, 2011).

Espécies são as unidades fundamentais de referência em todos os campos da biologia e, apesar disso, ainda não existe consenso acerca do que exatamente é uma espécie. Atualmente, existem mais de 22 conceitos de espécies (Mayden, 1997; Mallet, 2007). Embora um conceito possa predominar durante um certo período, nenhuma definição é universal dentro da biologia, e porque estes conceitos são formulados a partir das diferentes características biológicas dos organismos, fruto de processos históricos intrínsecos (De Queiroz, 1998).

Um conceito de espécie deve assinalar os critérios sob os quais um grupo de organismos pode ser considerado uma espécie e, geralmente, os conceitos referem-se a diferentes estágios do processo evolutivo. Assim, um grupo de organismos que pode ser considerado como uma espécie sob um conceito pode não o ser sob outro. É importante destacar também que os conceitos já propostos muitas vezes sobrepõem-se, não sendo necessariamente mutuamente excludentes (De Queiroz, 1998; 2005 a, b; 2007).

De acordo com Coyne e Orr (2004), de maneira geral, os conceitos podem ser baseados em: cruzamento, coesão genética e/ou fenotípica, coesão evolutiva e história evolutiva. Por conseguinte, a adoção de um ou outro conceito depende, inicialmente, do problema a ser abordado (Coyne e Orr, 2004).

Alguns pesquisadores propuseram, também, uma abordagem que reunisse os pontos em comum destes conceitos, unificando-os em um conceito geral.

Mayden (1997) alega que existe um relacionamento hierárquico entre os diferentes conceitos de espécie, e que o “conceito evolutivo” de espécie pode ser tomado como um conceito primário, ao qual todos os demais estariam subordinados. De acordo com Simpson (1961), o conceito evolutivo de espécie é definido como “uma linhagem (uma sequência de ancestrais-descendentes dentro de uma população) evoluindo separadamente das outras, que possui sua própria tendência evolutiva e papel histórico”. Sendo assim, Mayden (1997) considera que os demais conceitos de espécie são secundários em relação a este e que são ferramentas e/ou critérios operacionais que permitem reconhecer as espécies.

Por sua vez, De Queiroz (1998) argumenta que todos os conceitos de espécie, explícita ou implicitamente, descrevem as espécies como segmentos de linhagens de metapopulações que evoluem separadamente, onde, por linhagem, entende-se uma linha direta de ancestral-descendente, propondo o Conceito de Linhagem Geral de Espécie.

Neste trabalho, adotaremos este conceito.

1.7 Delimitação de espécies

Uma vez que as espécies são as unidades fundamentais de referência em todos os campos da Biologia, um dos objetivos centrais da Biologia Evolutiva é determinar quantas espécies existem, como elas evoluíram e elaborar conceitos e métodos que permitam a sua identificação e delimitação.

É importante distinguir entre dois processos que, embora relacionados, possuem objetivos diferentes: a delimitação de espécies e a identificação de espécies. A delimitação de espécies é o processo de reconhecimento de unidades biológicas, baseado em critérios operacionais (De Queiroz, 2007). A identificação de espécies é o processo de nomear as entidades taxonômicas.

Sob a perspectiva de metapopulações, aliados ao progresso teórico em análises filogenéticas e populacionais, novos métodos foram desenvolvidos para a delimitação de espécies (Sites e Marshall, 2003; Camargo e Sites, 2013). Embora vários tipos de fontes de dados possam ser utilizados para delimitar as espécies, como por exemplo, caracteres morfológicos, ecológicos, comportamentais, citogenéticos etc, os dados moleculares são cada vez mais empregados, pela grande quantidade de caracteres que fornecem. Além disso, os dados genéticos têm

potencial para fornecer evidência de divergência em um estágio inicial de diversificação de uma linhagem (Knowles e Carstens, 2007), desempenhando um papel cada vez mais importante na definição das espécies (Sites e Marshall, 2004).

A utilização de dados moleculares na metodologia de delimitação de espécies tem conduzido, de maneira geral, a novas propostas na caracterização de linhagens. Linhagens crípticas, normalmente não identificadas sem o auxílio de dados moleculares, podem ser reconhecidas; linhagens cujos caracteres fenotípicos não são suficientemente divergentes podem ser reconhecidas; linhagens formalmente reconhecidas são corroboradas ou revalidadas (Leavitt *et al*., 2015).

Existem diversos algoritmos, metodologias e programas descritos para delimitação de espécies: baseados em distância (Puillandre *et al*., 2012; Brown *et al*., 2012); em máxima parcimônia (Templeton *et al*., 1992; Hart e Sunday, 2007); máxima verossimilhança (Pons *et al*., 2006; Monaghan *et al*., 2009; Carstens e Dewey, 2010; Ence e Carstens, 2011); e estatística Bayesiana (Yang e Ranala, 2010).

As abordagens podem ser realizadas com base em um ou múltiplos lócus e alguns métodos podem empregar ambos. Os métodos unilócus são eficientes em proporcionar abordagens preliminares em grande escala, como, por exemplo, avaliações de diversidade de espécies. As limitações incorrem, particularmente, em linhagens de divergência recente onde existe retenção de polimorfismo ancestral ou *lineage sorting*, o que pode resultar em topologias que não refletem a história evolutiva do grupo (Taylor *et al*., 2000; Knowles e Carstens, 2007; Heled e Drummond, 2010). Em contraste, as análises multilócus podem fornecer hipóteses robustas de fronteiras entre as espécies com um grau elevado de confiança, uma vez que combinam marcadores com diferentes taxas evolutivas e que sofreram diferentes pressões seletivas (Yang e Rannala, 2010; Zhang *et al*., 2011; Satler *et al*., 2013).

Geralmente, uma filogenia contendo múltiplos táxons é construída e as espécies são delimitadas por critérios topológicos, como monofilia, comprimentos dos ramos e valores de suporte (Wiens, 2007). Outro critério comumente usado é a concordância entre dados de fontes independentes (como por exemplo, morfologia e moléculas) ou quando os indivíduos pertencem ao mesmo clado em filogenias baseadas em marcadores moleculares diferentes (Pons *et al*., 2006; O'Meara, 2010; Ence e Carstens, 2011).

Dentre os métodos de delimitação de espécies, aqueles baseados na teoria da coalescência são muito utilizados. A teoria da coalescência possui como estratégia empregar modelos matemáticos a uma amostra de *n* indivíduos de uma geração e traçar sua genealogia, rastreando todos os alelos de um gene compartilhados pelos membros desta população até atingir uma cópia ancestral, que representaria o ponto de união ou coalescência (Tavaré *et al*.,1997).

Um destes métodos é o *Poisson Tree Process* (PTP). Esta abordagem utiliza como modelo evolutivo o *Evolutionary Placement Algorithm* (EPA), que utiliza uma sequência de referência para procurar por outras sequências similares e inferir parentesco (Berger *et al*., 2011). Geralmente é utilizada em filogenias unilócus, podendo também ser utilizada em multilócus (Cottontail *et al*., 2014). Neste modelo, a delimitação de espécies é feita tomando por base uma árvore filogenética enraizada, não ultramétrica, onde os eventos de cladogênese são medidos em termos de número de substituições e que os mesmos são refletidos nos tamanhos dos ramos da topologia. A ultrametricidade das árvores de entrada não é necessária porque as taxas de especiação são calculadas diretamente a partir do número de substituições. Por este mesmo motivo, PTP é um método robusto e rápido. Assume-se que cada substituição possui uma probabilidade mínima de gerar uma especiação e que cada substituição é independente da outra, seguindo uma distribuição binominal. Para cada ramo da árvore de referência é retirado um conjunto de sequências que são rearranjadas e cuja probabilidade é calculada, sendo descartadas as sequências que possuem probabilidade < 0.5 (Zhang *et al*., 2013).

Outro método é o modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*), que foi introduzido por Pons *et al*. (2006) e utiliza um modelo simples de evolução, para um único lócus, assumindo que as diferenças evolutivas entre espécies e populações resultam em diferentes taxas de ramificação em uma árvore de gene. Esta metodologia combina o modelo coalescente com o modelo Yule de eventos de especiação intraespecíficos (o modelo de especiação de Yule assume uma condição de intercâmbio onde, a qualquer tempo, uma espécie existente pode originar uma nova espécie). Assim, para uma dada topologia, um terminal é escolhido aleatoriamente e testado como ancestral de dois novos terminais (Steel e MacKenzie, 2001).

Para o modelo GMYC os autores assumem que o mesmo considera as entidades como espécies sob o conceito proposto por De Queiroz (1998). Para PTP, na descrição original do método, os autores basearam-se no conceito filogenético de espécie (*Phylogenetic Species Concept* - PSC) para desenvolver o modelo de especiação sob o qual o método PTP trabalha (Zhang *et al*., 2013). Como neste trabalho assumiremos o conceito de De Queiroz (1998) de metapolulações, que conforme Mayden (1997) “englobaria” também o conceito filogenético, ambos os métodos podem ser empregados nesta abordagem.

As metodologias de delimitação de espécie vêm sendo aplicadas na resolução de incertezas taxonômicas, especialmente para táxons com linhagens crípticas ou que possuem muitas subespécies descritas, nos mais diversos grupos de organismos, como aranhas (Satler, 2013), lêmures (Groeneveld *et al*., 2009), crocodilianos (Shirley *et al*., 2014), lagartos (Leaché e Fujita, 2010), entre outros. Na Subordem das Serpentes, a delimitação de espécies utilizando dados moleculares em abordagens coalescentes já foi realizada em *Sistrurus* (Kubatko *et al*., 2011), *Hydrophiinae* (Ukuwela *et al*., 2013), *Lampropeltis* (Ruane *et al*., 2014) e *Crotalus* (Bryson *et al*., 2014).

As serpentes do complexo *Boa constrictor* representam um modelo de organismos no qual novas abordagens de delimitação de espécies poderão auxiliar na elucidação dos problemas taxonômicos, pois possui ampla distribuição na região Neotropical (Henderson e Powel, 2007), muitas subespécies (Bonny, 2007; Uetz e Hallerman, 2013) e indicação de diversidade críptica (Hynková *et al*., 2009; Reynolds *et al*.; 2013; Suárez-Atilano *et al*., 2014; Card *et al*., 2016).

Tabela 1 - Resumo das descrições, redescrições e sinonimizações para Boa constrictor. Retirado de Bonny (2007).

NO	AUTOR	DESCRIÇÃO
1564	Laudonniere	Primeiro registro de *Boa*
1734	Sebas	Registros/desenhos de *Boa,* em "*Lo cumpletissimi Rerum Naturalium Thesauri*"
1758	Linnaeus	Publicação da 10ª edição de "*Systema Naturae*". Muitas espécies reunidas dentro do gênero *Boa* (ex.: *Boa canina, Boa cenchria, Boa constrictor, Boa murina*)
1768	Laurenti	Publicação de "*Reptilium*", com descrição de várias serpentes sob o gênero *Constrictor*: *C. formossimus, C. rexserpentum, C. auspex, C. diviniloquus, C. orophia* (= sinônimos de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758)
1801	Schneide	*Boa constrictor*
1803	Daudin	*Boa imperator*
1841	Eydoux e Souleyet	*Boa eques*
1843	Fitzinger	Atribuição de *Boa constrictor* como espécie tipo do gênero *Boa,*
1844	Dumeril e Bibron	*Boa diviniloqua*
1863	Jan	*Boa diviniloquax* var. *mexicana*
1873	Philipi	*Boa occidentalis*
1878	Cope	*Boa ortonii*
1882	Duméril e Bocourt	*Boa mexicana*
1883	Garman	*Boa constrictor* var. *isthmica*
1901	Stejneger	Atribuição (após revisão da obra de Laurenti) de *Boa canina* como espécie tipo do gênero *Boa* e revalidação do gênero *Constrictor*, inclusão das espécies descritas até o momento dentro do gênero *Boa*
1901 a 1950		Reconhecimento do gênero *Constrictor* por vários herpetologistas
1910	Ihering	*Constrictor constrictor imperator, Constrictor constrictor occidentalis*
1924	Barbour e Amaral	*Constrictor constrictor constrictor*
1929	Amaral	*Constrictor constrictor orophias*
1929	Barbour e Loveridge	*Epicrates sabogae Barbour, 1906 (= Constrictor constrictor sabogae)*
1932	Stull	*Constrictor constrictor amarali (subesp. nov)*
1935	Stull	Checklist da Familia Boidae , com as seguintes espécies e subespécies do gênero *Constrictor: C. constrictor constrictor , C. c. amarali , C. c. imperator*, *C. c.r mexicanus , C. c. occidentalis* , *C. c. sabogae*, *C. c. orophias*
1945	Smith	*Constrictor constrictor sigma* (subesp. nov)
1943	Schmidt e Walker	*Constrictor constrictor ortonii*
1951	Forcart	Revalidaçãodo gênero *Boa* (após revisão de Fitzinger, 1843), de acordo com o código internacional de nomenclatura. De acordo com Forcart (1951), as espécies e subespécies do gênero passaram a ser: *Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758; *Boa constrictor amarali* Stull, 1932; *Boa constrictor imperator* Daudin, 1803; *Boa constrictor occidentalis* Philippi, 1873; *Boa constrictor sabogae* Barbour, 1929; *Boa orophias* Linnaeus, 1758. Mesmo assim, o nome *Constrictor* para o gênero ainda foi mantido por muito tempo em algumas descrições.
1964	Lazell	*Constrictor constrictor nebulosus* (subesp. nov); *Constrictor constrictor orophias.*
1969	Stimson	Publicação de " *Liste der rezenten Amphibien und Reptilien*", onde *Boa* é monotípico, com as seguintes subespécies: *Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758; *Boa constrictor amarali* Stull, 1932; *Boa constrictor imperator* Daudin, 1803; *Boa constrictor nebulosa* Lazell, 1964; *Boa constrictor occidentalis* Philippi, 1873; *Boa constrictor ortonii Cope, 1878; Boa constrictor orophias* Linnaeus, 1758; *Boa constrictor sabogae* Barbour, 1906.
1983	Langhammer	*Boa constrictor melanogaster* (subesp. nov)
1991	Price e Russo	*Boa constrictor longicauda* (subesp. nov)
1991	Kluge	Propõe a sinonimização das espécies de boídeos de Madagascar em *Boa*: *Acrantophis madagascariensis = Boa madagascariensis*; *Acrantophis dumerili = Boa dumerili e Sanzinia madagascariensis = Boa manditra.*

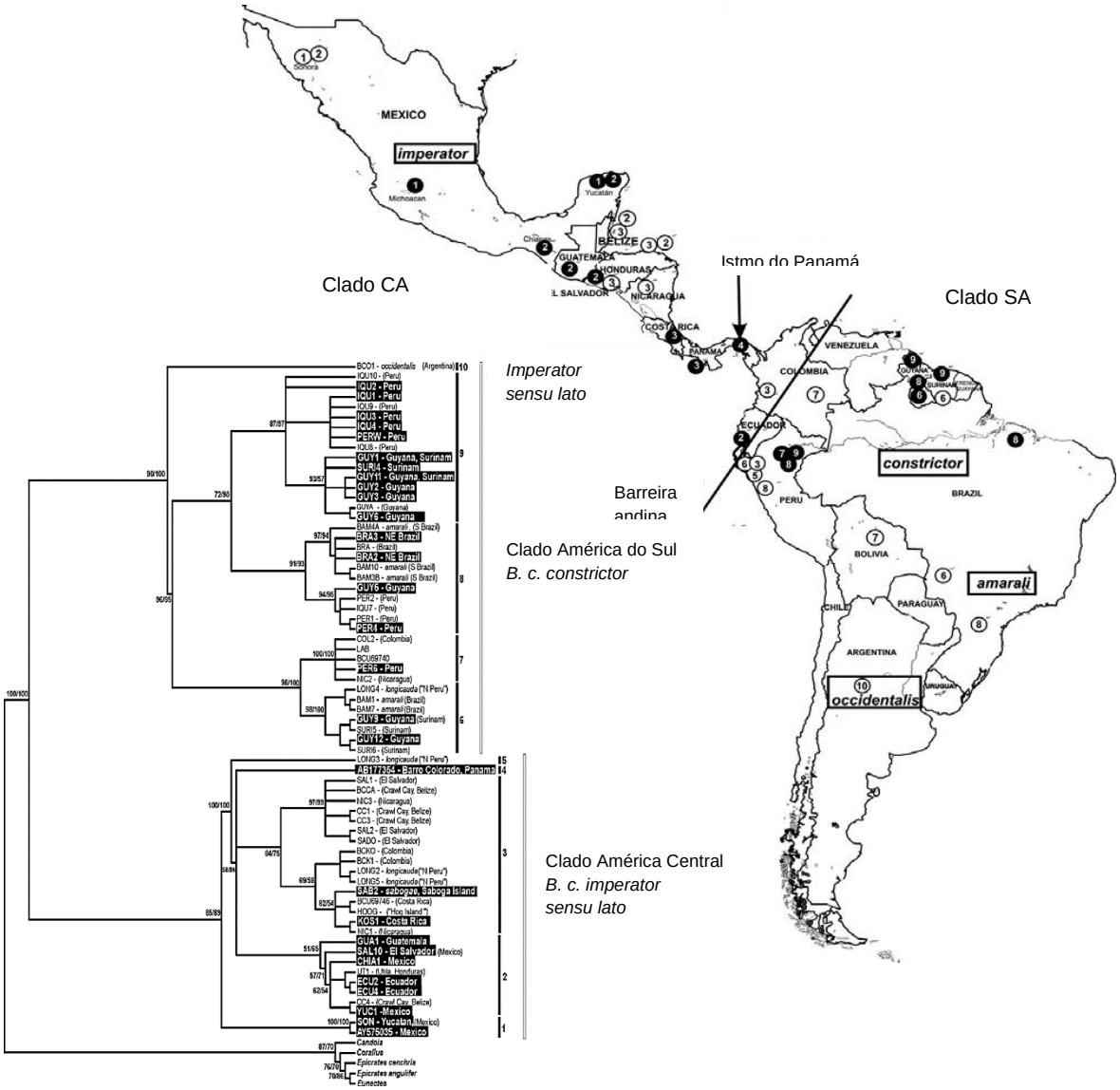


Figura 1 - Topologia obtida a partir de Máxima Parcimônia com base no gene Cytb, mostrando dois grupos recuperados, um clado na América do Sul e outro na América Central. À direita, mapa mostrando a distribuição dos haplótipos. Os números dentro dos círculos brancos e pretos referem-se aos grupos de haplótipos e correspondem aos números ao longo da barra vertical na árvore à esquerda. Figura retirada e modificada de Hynková *et al*. (2009).

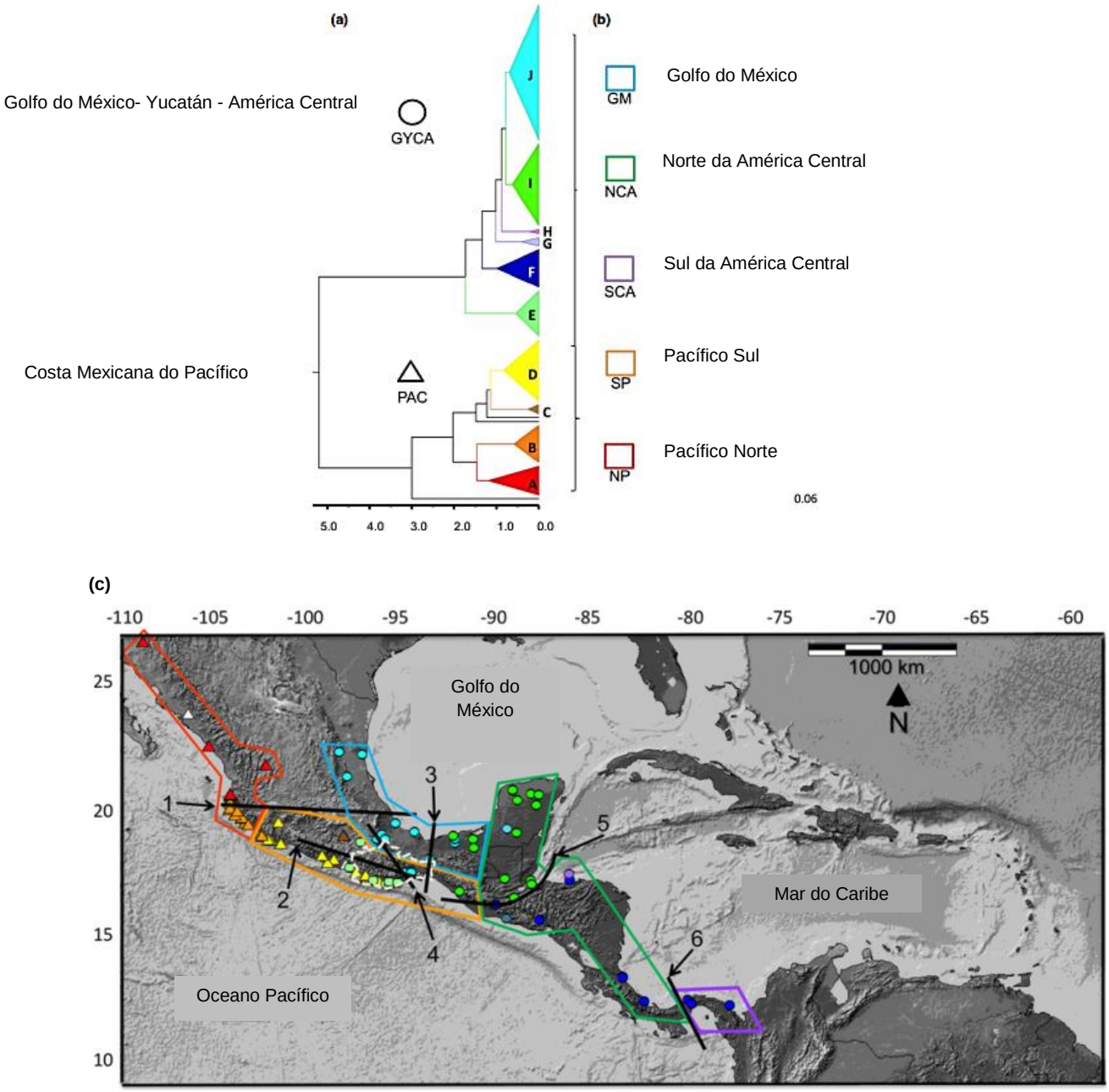


Figura 2 - a) Filogenia com datação molecular mostrando dois clados principais e 10 haplogrupos recuperados dentro de *B. c. imperator* procedentes do México e América Central: Costa Mexicana do Pacífico, PAC (grupos A-DGolfo do México- Península de Yucatán da América Central, GYCA (grupos E-J). A escala de tempo é mostrada na parte inferior (em milhões de anos - Ma). b) Delimitação espacial de cinco agrupamentos genéticos, representados por quadrados coloridos, nomeados com relação à localização geográfica. c) Mapa mostrando a localização geográfica das amostras agrupadas nas duas principais linhagens recuperadas na filogenia PAC, representada por triângulos e GYCA, representada por círculos.As linhas coloridas delimitam os cinco agrupamentos genéticos descritos em (b). As linhas sólidas pretas representam as principais barreiras geográficas consideradas no trabalho: (1) Cinturão Vulcânico Trans-Mexicano; (2) Serra Madre do Sul; (3) Istmo de Tehuantepec; (4) Serra Norte de Oaxaca; (5) Sistema de falhas Motagua-Polochic-Jocot; (6) sistema de Chagres Rio e Canal do Panamá. Retirado e modificado de Suárez-Atilano *et al*., (2014).

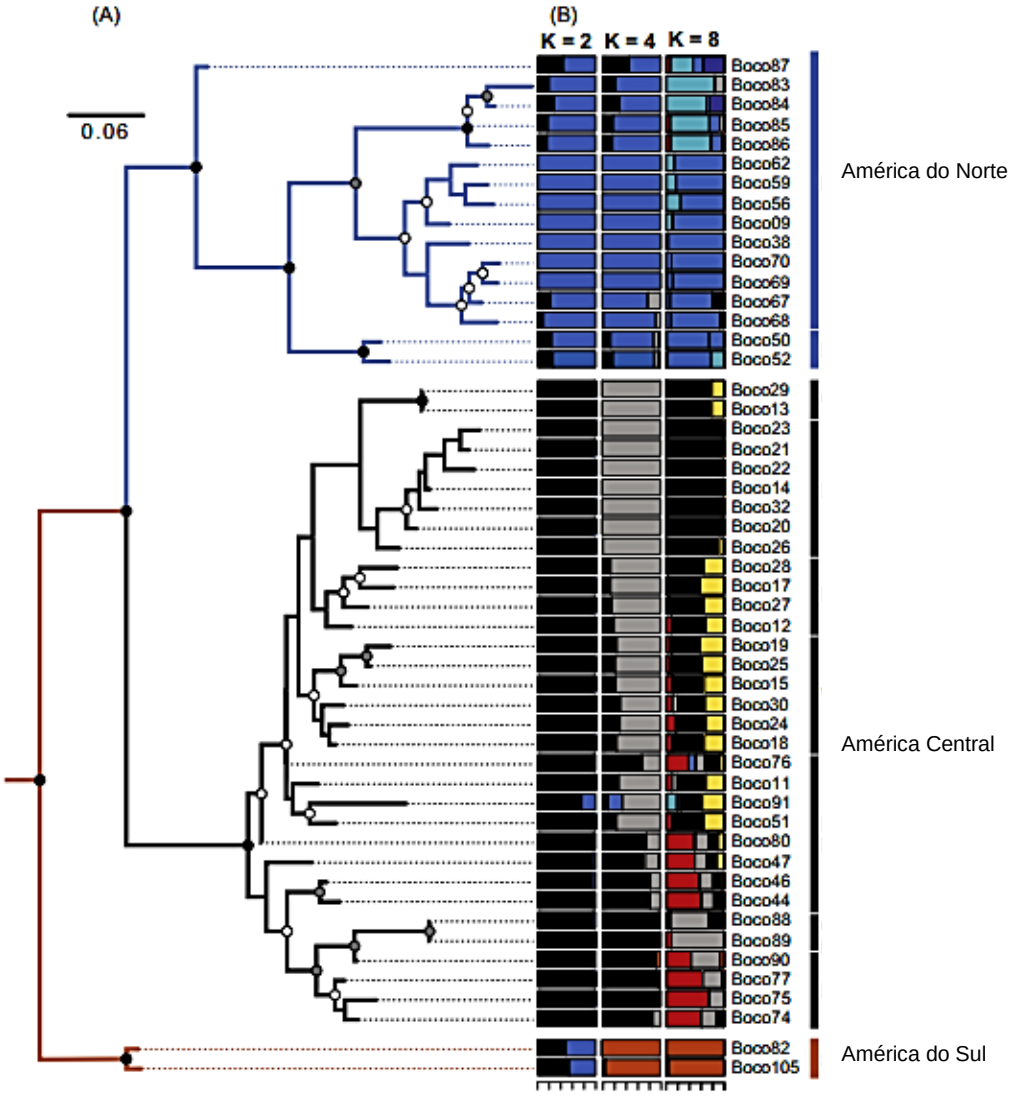


Figura 3 - Relações filogenéticas de *Boa*, inferidos com base em SNPs. Cladograma inferido utilizando o modelo de nascimento-morte no RAxML. Os ramos foram coloridos de acordo com a distribuição geográfica dos clados: América do Norte (azul), América Central (preto), América do Sul (laranja). Os nós estão coloridos de acordo com o suporte (probabilidade posterior): preto = > 95%, cinza = entre 75% e 95%, branco = entre 50% e 75%, e sem símbolos nos nós= < 50%. Retirado e modificado de Card *et al*. (2016).

2 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo realizar investigações acerca das relações filogenéticas e história evolutiva do complexo de *Boa constrictor.*

Especificamente, pretende-se:

(1) investigar as relações filogenéticas entre subespécies de *B. constrictor*;

(2) investigar a existência de suporte genético para os táxons recuperados na filogenia dentro do complexo *B. constrictor*, utilizando-se a metodologia de delimitação de espécie com base em modelo de coalescência;

(3) correlacionar os dados moleculares com a distribuição espacial do grupo, em busca de um padrão biogeográfico e compará-lo àqueles de outros grupos de organismos descritos nas literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Ao total, foram utilizadas amostras de 217 exemplares de *Boa constrictor*, procedentes de 162 localidades distribuídas ao longo da região Neotropical, incluindo Brasil, Equador, Venezuela, Trindade e Tobago, Bahamas, El Salvador, Costa Rica, México, Nicarágua, Belize, Argentina, Peru, Guatemala, Panamá, Honduras, Guiana e Suriname. A maioria das amostras possuíam identificação apenas ao nível de espécie. As identificações seguiram os *vouchers* dos museus, a partir dos quais as amostras foram cedidas, ou a identificação da sequência no caso das amostras do *GenBank*.

Na ausência dessas informações, foi mantido apenas o nome da espécie. Registros fotográficos foram obtidos de exemplares coletados em campo ou em criadouros para identificação. Ao todo, 59 indivíduos possuíam identificação (34 obtidos neste trabalho e 25 do *GenBank*), englobando 10 subespécies: *Boa c. amarali, Boa c. constrictor, Boa c. imperator, Boa c. longicauda, Boa c. melanogaster, Boa c. occidentalis, Boa c. orophias, Boa c. ortonii, Boa c. nebulosa* e *Boa c. sabogae* (Tabelas 2 e 3, Figura 4).

Neste trabalho, foram produzidas 344 sequências para 121 exemplares de *Boa constrictor*, sendo 34 exemplares identificados ao nível de subespécies,

onde: sete são de *B. c. amarali*, 11 *B. c. constrictor*, nove *B. c. imperator*, uma *B. c. longicauda*, uma *B. c. melanogaster*, quatro *B. c. occidentalis*, e uma *B. c. ortonii* (Tabela 2). Os demais 87 indivíduos possuem identificação somente até o nível específico.

Adicionalmente, foram utilizadas sequências procedentes do *GenBank* de 96 indivíduos, onde: sete são de *B. c. constrictor*, quatro de *B. c. imperator,* duas de *B. c. longicauda,* três de *B. c. nebulosa*, duas de *B. c. occidentalis,* três de *B. c. orophias,* uma de *B. c.ortonii,* três de *B. c. sabogae*, e 71 identificados apenas ao nível de espécie, totalizando 122 sequências (Tabela 3).

Foram empregadas 10 sequências das seguintes espécies de Boidae como grupo-externo: *Charina bottae, Corallus batesii, Corallus caninus,Corallus hortulanus, Epicrates cenchria, Eunectes murinus* e *Eunectes notaeus*, e o enraizamento das árvores foi feito em *Charina bottae* (Tabela 3).

3.1.2 Esclarecimentos sobre amostras

A amostra CORBIDI3790 de Tumbes, Peru (Tabela 2) foi cedida para a realização deste estudo pelo Centro de Ornitologia e Biodiversidad (Lima, Peru) e estava identificada, na amostra, como *B. c. imperator*, mas no *voucher* do museu, como *B. c. ortonii.*

As amostras provenientes do Equador, QCZAR5636 (El Mango, parte do pacífico) e QCZAR6476 (Orellana, porção amazônica) não foram identificadas ao nível subespecífico (Tabela 2), porém as populações trans-Andinas de *B. constrictor*, até o momento, são referentes a *B. c. imperator*; e na América do Sul, as duas subespécies propostas são *B. c. ortonii* e *B. c. longicauda*, enquanto que para o extremo oeste amazônico, a subespécie reconhecida é *B. c. melanogaster*. Assim, considerando-se que os morfótipos das subespécies são associadas às suas localidades de origem, as amostras trans-Andinas do Peru e do Pacífico equatoriano serão aqui chamadas de *B. c. longicauda* (CORBIDI3790) e *B. c. ortonii* (QCZAR5636), respectivamente; e a amostra procedente da amazônia equatoriana (QCZAR6476) de *B. c. melanogaster*, dada a proximidade das respectivas localidades-tipo (Paulo Passos, comunicação pessoal) (Tabela 2).

Para *B. c. occidentalis,* apesar de os exemplares não possuírem localidade de origem especificada, foram identificados dessa forma por profissionais

experientes na taxonomia do grupo - Valdir Germano (técnico responsável pela Coleção Herpetológica do Laboratório Especial de Coleções Zoólogicas do Instituto Butantan) e Dr. Paulo Passos (Museu Nacional). Desta forma, as sequências aqui geradas para estes exemplares representam registros inequívocos (Tabela 2).

Referente às amostras obtidas do *GenBank* (Tabela 3), EU273629 (Guiana) e EU273630 (Suriname), procedentes do trabalho de Hynková *et al*. (2009), possuem identificação como *Boa constrictor constrictor* no trabalho publicado, mas estão catalogadas como *Boa constrictor imperator* no *GenBank.* Uma vez que não há descrição de *B. c. imperator* para a parte cis-andina, optou-se por utilizar a identificação da publicação de *Boa constrictor constrictor* para estas duas amostras.

A amostra EU273612 de *B. c. longicauda* (Hynková *et al*., 2009), não possui localidade exata descrita. As amostras KF576703 de *B. c. longicauda,* KF57673, KF576698 e KF576699 de *B. c. nebulosa* KF576701, KF576703 e KF576734, de *B. c. orophias*; KF576739 de *B. c. ortonii* e KF576714, KF576715 de *B. c. sabogae*, estão depositadas no *GenBank*, mas não foram publicadas. Apesar disso, essas sequências foram utilizadas no presente estudo por representarem subespécies para as quais não possuíamos amostras. Para as subespécies *B. c. nebulosa*, *B. c. orophias* e *B. c. sabogae*, uma vez que não possuem localidade exata e que são endêmicas de ilhas, empregou-se a localidade tipo destas subespécies para plotá-las no mapa de amostras (Figura 4).

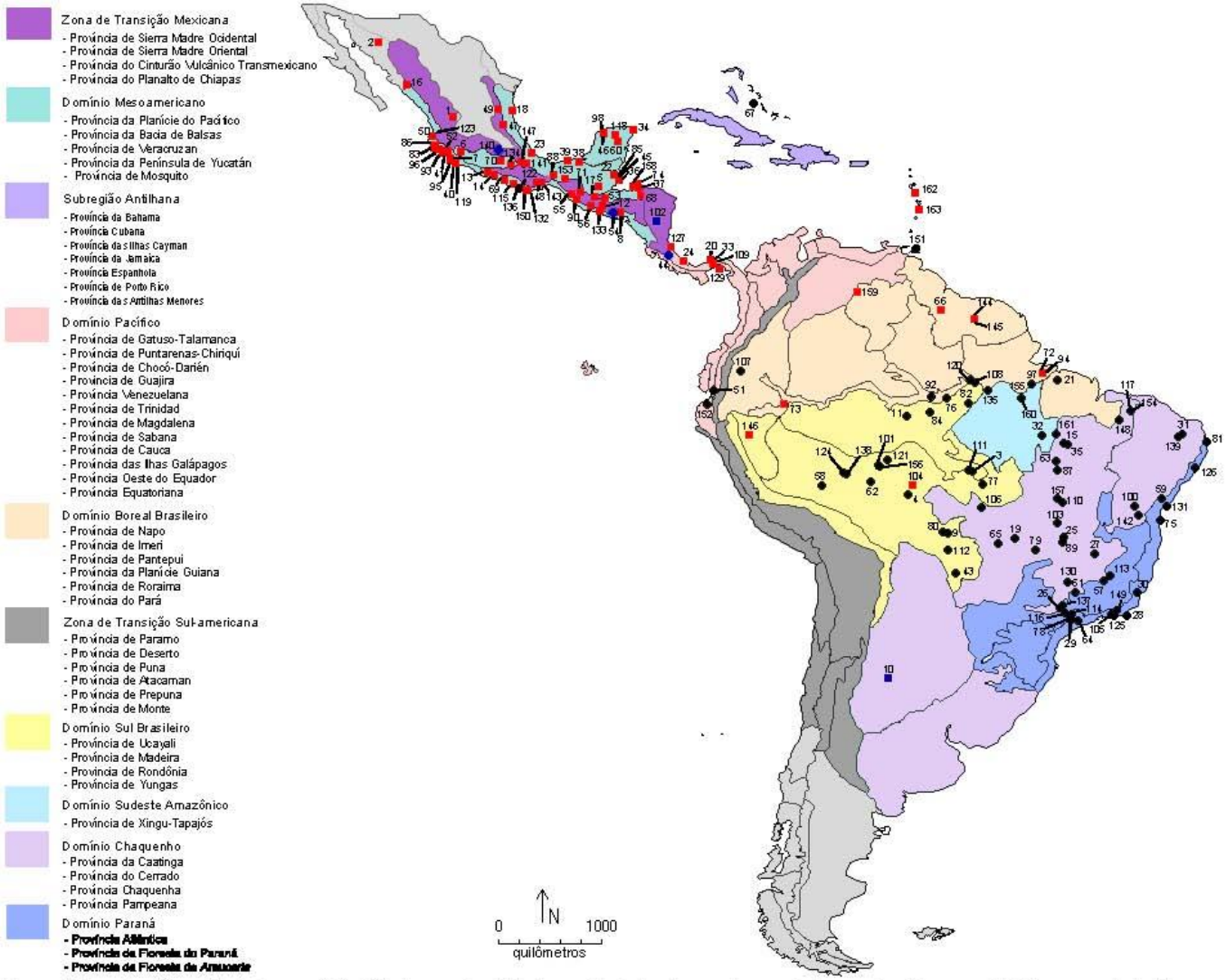


Figura 4. Mapa da região neotropical com a distribuição das amostras utilizadas neste trabalho. As cores do mapa indicam os domínios e as subdivisões as províncias de Morrone (2014). Os círculos pretos representam as localidades amostradas neste trabalho, quadrados vermelhos representam amostras do GenBank: Hynková *et al.* (2009), Suárez-Altiano *et al.* (2014) e Card *et al.* (2016), e os quadrados azuis representam localidades obtidas neste trabalho e do GenBank.

Tabela 2 - Informações sobre as amostras utilizadas no presente trabalho para as quais foram produzidas sequências inéditas, contendo morfótipo, voucher ou número de coleta no campo, localidade, unidade federativa (UF disponíveis apenas para o Brasil), país de origem e coordenadas geográficas. Relação dos genes amplificados para cada amostra: Cytb = citocromo b; ND4 = NADH desidrogenase subunidade 4; NTF3 = neurotrofina 3; ODC = ornitina descarboxilase. A última coluna refere-se ao número da localidade plotada no mapa de amostras (Figura 4).

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	LCBL1	Rio Branco	AC	Brasil	-99560	-678670	x	x	x	x	124
Boa constrictor	LCBL3	Rio Branco	AC	Brasil	-99560	-678670	x	x			124
Boa constrictor	LCBL2	Senador Guiomard	AC	Brasil	-100696	-676091	x	x	x	x	138
Boa constrictor	LCBL4	Senador Guiomard	AC	Brasil	-100696	-676091		x		x	138
Boa constrictor	MTR19406	Arumã	AM	Brasil	-47340	-621501	x	x	x	x	11
Boa constrictor	MNRJ17942	Itacoatiara	AM	Brasil	-313287	-5843864		x	x		76
Boa constrictor	MTR18710	Lago Chaviana	AM	Brasil	-44070	-599434	x	x		x	84
Boa constrictor	LCBL12	Manaus	AM	Brasil	-30038	-599187	x				92
Boa constrictor	LCBL13	Manaus	AM	Brasil	-30038	-599187	x	x	x	x	92
Boa constrictor	LCBL14	Manaus	AM	Brasil	-30038	-599187		x			92
Boa constrictor	CHBEZ42	Rio Largo	AL	Brasil	-94819	-358394	x	x	x	x	126
Boa constrictor	MTR20065	Mucugê	BA	Brasil	-130081	-413712	x	x	x	x	100
Boa constrictor	MTR23015	Sincorá	BA	Brasil	-1375871	-4104262			x	x	142
Boa constrictor	CHUNB49612	Brasília	DF	Brasil	-158131	-477657	x	x	x	x	25
Boa constrictor	MJJS226	Jandaia	GO	Brasil	-169520	-504465	x			x	79
Boa constrictor	MJJS270	Paraúna	GO	Brasil	-169.680	-583.416	x			x	112
Boa constrictor	CHUNB40660	Luziânia	GO	Brasil	-162435	-479301			x		89
Boa constrictor	IBSP84445	Niquelândia	GO	Brasil	-144627	-484482	x		x	x	103
Boa constrictor	CHUNB52157	Carolina	MA	Brasil	-73354	-474640	x		x	x	35
Boa constrictor	CHUNB52158	Carolina	MA	Brasil	-73354	-474640		x		x	35
Boa constrictor	ESTR00015	Carolina	MA	Brasil	-73354	-474640	x	x		x	35

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	CHUNB44537	Buritizeiro	MG	Brasil	-173598	-449731	x	x	x	x	27
Boa constrictor	MTR19522	PARNA Serra do Cipó	MG	Brasil	-193490	-436194	x	x	x	x	113
Boa constrictor	MNRJ20989	Corumbá	MS	Brasil	-1900793	-5765197	x	x	x	x	43
Boa constrictor	MHO334	Araputanga	MT	Brasil	-154706	-583555		x	x	x	9
Boa constrictor	RHO1022	Jauru	MT	Brasil	-153446	-588741	x	x		x	80
Boa constrictor	RVSS33	Nova Ubiratã	MT	Brasil	-130357	-552599	x	x	x	x	106
Boa constrictor	UFA223	Paranaíta	MT	Brasil	-96731	-564714	x	x	x	x	111
Boa constrictor	UFA308	Paranaíta	MT	Brasil	-96731	-564714				x	111
Boa constrictor	UFA359	Paranaíta	MT	Brasil	-96731	-564714				x	111
Boa constrictor	ALT256	Alta Floresta	MT	Brasil	-119287	-619829	x		x	x	3
Boa constrictor	CTMZ06043	Barra do Garça	MT	Brasil	-15853496	-52270447	x	x	x	x	19
Boa constrictor	CTMZ05754	Guiratinga	MT	Brasil	-163463	-537561	x	x	x	x	65
Boa constrictor	CTMZ06126	Itaúba	MT	Brasil	-110080	-552427	x	x	x	x	77
Boa constrictor	MPEG24472	Belém	PA	Brasil	-14436	-484410	x	x		x	21
Boa constrictor	MPEG24581	Belém	PA	Brasil	-14436	-484410	x	x	x	x	21
Boa constrictor	MPEG22195	Canaã dos Carajás	PA	Brasil	-65300	-498532	x	x	x	x	32
Boa constrictor	MPEG24334	Juriti	PA	Brasil	-360632	-5647303		x	x	x	82
Boa constrictor	MPEG24428	Juriti	PA	Brasil	-360632	-5647303	x	x	x	x	82
Boa constrictor	MPEG21584	Melgaço	PA	Brasil	-179775	-5073858	x	x	x	x	97
Boa constrictor	MPEG22304	Oriximiná	PA	Brasil	-17615	-558565		x	x	x	108
Boa constrictor	MNRJ16818	Porto Trombetas	PA	Brasil	-145493	-5638186	x	x	x	x	120
Boa constrictor	MIGUEL5677	Porto Trombetas	PA	Brasil	-145493	-5638186	x	x		x	120
Boa constrictor	FIT1	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349	x			x	135
Boa constrictor	FIT10	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349		x			135
Boa constrictor	FIT4	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349	x	x			135
Boa constrictor	FIT5	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349	x			x	135
Boa constrictor	FIT6	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349				x	135

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	FIT8	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349	x	x	x	x	135
Boa constrictor	FIT9	Santarém	PA	Brasil	-24406	-547349		x		x	135
Boa constrictor	BM090	UHE Belo Monte	PA	Brasil	-31150	-517026	x	x	x	x	155
Boa constrictor	BM326	Vitória do Xingu	PA	Brasil	-31277	-517003	x	x		x	160
Boa constrictor	CHUNB61848	Piripiri	PI	Brasil	-42757	-417717	x				177
Boa constrictor	IBSP79522	Piripiri	PI	Brasil	-42757	-417717	x	x	x	x	177
Boa constrictor	MNRJ22936	Cabo Frio	RJ	Brasil	-229218	-420412	x	x	x	x	28
Boa constrictor	MNRJ24860	Nova Iguaçú	RJ	Brasil	-227550	-434622	x			x	105
Boa constrictor	MNRJ19412	Rio de Janeiro	RJ	Brasil	-229784	-433050	x	x		x	125
Boa constrictor	MNRJ19564	Rio de Janeiro	RJ	Brasil	-229784	-433050	x			x	125
Boa constrictor	MNRJ19740	Rio de Janeiro	RJ	Brasil	-229784	-433050	x	x	x	x	125
Boa constrictor	MNRJ23144	Rio de Janeiro	RJ	Brasil	-229784	-433050		x		x	125
Boa constrictor	MNRJ20700	Teresópolis	RJ	Brasil	-224161	-429812	x	x	x		149
Boa constrictor	CHBEZ1196	Caicó	RN	Brasil	-64669	-370856	x	x	x	x	31
Boa constrictor	CHBEZ1254	Serra Negra do Norte	RN	Brasil	-66624	-373961	x	x	x	x	139
Boa constrictor	CHUNB53038	Alta Floresta d'Oeste	RO	Brasil	-119287	-619829	x		x	x	3
Boa constrictor	H1293	Porto Velho	RO	Brasil			x	x	x	x	121
Boa constrictor	CHUNB22028	Guajará-Mirim	RO	Brasil	-107741	-653368	x	x	x	x	62
Boa constrictor	HJ0547	Mutum-Paraná	RO	Brasil	-92868	-645488	x	x	x	x	101
Boa constrictor	HJ0203	UHE Jirau	RO	Brasil	-92582	-646498	x	x	x	x	156
Boa constrictor	CTMZ04345	Brotas	SP	Brasil	-2227979	-4812559		x			26
Boa constrictor	CTMZ04373	Brotas	SP	Brasil	-2227979	-4812559	x	x	x	x	26
Boa constrictor	CTMZ04377	Brotas	SP	Brasil	-2227979	-4812559		x		x	26
Boa constrictor	CTMZ04426	Brotas	SP	Brasil	-2227979	-4812559				x	26
Boa constrictor	CTMZ00603	Paulínia	SP	Brasil	-227650	-471489	x	x	x	x	114
Boa constrictor	LCBL15	Piracicaba	SP	Brasil	-227275	-476622	x	x	x	x	116
Boa constrictor	LCBL16	Piracicaba	SP	Brasil	-227275	-476622	x	x		x	116

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	LCBL17	Piracicaba	SP	Brasil	-227275	-476622	x				116
Boa constrictor	LCBL10	São Carlos	SP	Brasil	-219896	-478850	x			x	137
Boa constrictor	LCBL8	São Carlos	SP	Brasil	-219896	-478850	x			x	137
Boa constrictor	LCBL9	São Carlos	SP	Brasil	-219896	-478850	x		x	x	137
Boa constrictor	MRT7189	Guaraí	TO	Brasil	-88358	-485139	x	x	x	x	63
Boa constrictor	MRT4377	Paranã	TO	Brasil	-126153	-478760	x	x	x	x	110
Boa constrictor	CTMZ00167	Lajeado	TO	Brasil	-972146	-4835991			x	x	87
Boa constrictor	CTMZ00744	UHE Peixe-Angical	TO	Brasil	-122.333	-4.836.666		x	x	x	157
Boa constrictor	CTMZ00798	UHE Peixe-Angical	TO	Brasil	-122.333	-4.836.666		x		x	157
Boa constrictor	CTMZ00855	UHE Peixe-Angical	TO	Brasil	-122.333	-4.836.666	x	x		x	157
Boa constrictor	LCBL20	Xambioá	TO	Brasil	-641300	-485351	x	x	x	x	161
Boa constrictor	MNRJ	Falcón (ESTADO)		Venezuela	-110850	-6978402	x			x	58
Boa constrictor amarali	IBSP79064	Esmeraldas	MG	Brasil	-198072	-441800	x	x	x	x	57
Boa constrictor amarali	IBSP84579	Fortaleza de Minas	MG	Brasil	-208484	-467085	x	x	x	x	61
Boa constrictor amarali	IBSP84580	Sacramento	MG	Brasil	-198704	-474383	x	x	x	x	130
Boa constrictor amarali	IBSP84578	Cabreúva	SP	Brasil	-233051	-471362	x	x	x	x	29
Boa constrictor amarali	IBSP84577	Guarulhos	SP	Brasil	-234259	-465376	x	x	x	x	64
Boa constrictor amarali	IBSP84595	Itú	SP	Brasil	-232653	-472870	x	x	x	x	78
Boa constrictor amarali	MTR7659	Babaçulândia	TO	Brasil	-72031	-477608	x	x	x	x	15
Boa constrictor constrictor	IBSP79087	Feira de Santana	BA	Brasil	-122581	-389597			x	x	59
Boa constrictor constrictor	IBSP79088	Feira de Santana	BA	Brasil	-122581	-389597		x		x	59
Boa constrictor constrictor	IBSP79089	Feira de Santana	BA	Brasil	-122581	-389597				x	59
Boa constrictor constrictor	IBSP79086	Itacaré	BA	Brasil	-142816	-389981		x		x	75
Boa constrictor constrictor	IBSP79031	Salvador	BA	Brasil	-1297319	-3848711	x	x	x	x	131
Boa constrictor constrictor	IBSP79032	Salvador	BA	Brasil	-1297319	-3848711		x		x	131
Boa constrictor constrictor	IBSP79063	Cachoeiro do Itapemirim	ES	Brasil	-208616	-411285	x	x	x	x	30
Boa constrictor constrictor	MBIB5605	João Pessoa	PB	Brasil	-71355	-348388		x	x	x	81

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor constrictor	MBIB4038	Teresina	PI	Brasil	-51026	-427809	x	x	x	x	148
Boa constrictor constrictor	MTR7733	Babaçulândia	TO	Brasil	-720057	-4775901		x		x	15
Boa constrictor constrictor	UVM42			Trinidad				x	x		151
Boa constrictor imperator	UVM53	Hog Island		Bahamas					x		67
Boa constrictor imperator	UVM54	Hog Island		Bahamas				x			67
Boa constrictor imperator	UVM51			El Salvador				x	x		54
Boa constrictor imperator	UVM52			Costa Rica				x	x		44
Boa constrictor imperator	UVM57	Sierra Tharumara		México				x	x		140
Boa constrictor imperator	UVM59			Nicarágua				x			102
Boa constrictor imperator	UVM60			Nicarágua					x		102
Boa constrictor imperator	UVM76			Belize					x		22
Boa constrictor imperator	UVM77			Belize				x			22
Boa constrictor longicauda	CORBIDI3790	Tumbes, El Tutumo		Peru	-369682	-8025573	x	x	x	x	152
Boa constrictor melanogaster	QCZAR6476	Orellana (província)		Equador	-65826	-7719865	x		x	x	107
**Boa constrictor occidentalis*	IBSP83333			Argentina?			x	x	x	x	10
**Boa constrictor occidentalis*	LCBL21			Argentina?			x	x	x	x	10
**Boa constrictor occidentalis*	LCBL23			Argentina?			x	x	x	x	10
**Boa constrictor occidentalis*	LCBL25			Argentina?						x	10
Boa constrictor ortonii	QCZAR5636	El Mango (região)		Equador	-245232	-7962156	x		x	x	51

IBSP = Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil); CHUNB = Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (Brasília, Brasil); CHBEZ = Coleção Herpetológica do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da UFRN (Natal, Rio Grande do Norte, Brasil); CORBIDI = Centro de Ornitologia e Biodiversidad (Lima, Peru); FIT = Faculdades Integradas do Tapajós (Santarém, PA, Brasil); MBIB = Museu Biológico do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil); MNRJ = Museu Nacional (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); MPEG = Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, PA, Brasil); QCZAR = Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del *Ecuador*; UVM =Universidade de Medicina Veterinária (Viena, Áustria). MJJS = amostras do banco de tecidos da pesquisadora Maria José de Jesus Silva. As amostras enumeradas como LCBL foram retiradas ou coletadas pessoalmente pela aluna Lorena Corina Bezerra de Lima. As amostras IBSP83333, LCBL21, LCBL23 e LCBL25, embora não possuam localidade de origem, foram cedidas pelo Instituto Butantan e pelo Criadouro Jibóias Brasil, e pertecem a animais que seguramente foram identificados como sendo da subespécie *B.c.occidentalis.** Coordenadas aproximadas.

Tabela 3 - Sequências retiradas do *GenBank*: identificação do morfótipo, voucher ou número de coleta no campo, localidade, país de origem, coordenadas geográficas. Relação dos genes amplificados para cada amostra: Cytb = citocromo b; ND4 = NADH desidrogenase subunidade 4; NTF3 = neurotrofina 3; ODC = ornitina descarboxilase. A última coluna refere-se ao número da localidade plotada no mapa de amostras (Figura 4). Referência das amostras: EU, GQ = Hynková *et al*., 2009; KJ = Suárez-Altilano *et al*., 2014; KX = *Card et al*., 2016. * Grupos externos . ** Dados depositados no *GenBank* mas não publicados.

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	KJ621415	Rondônia	Nova Brasilia	Brazil	-11150	-61.57	x				104
Boa constrictor	KJ621416	Alamos	"Sonora"	Mexico	29212	-110136	x			x	2
Boa constrictor	KJ621417	Beldiraguato	Sinaloa	Mexico	25221	-107610	x				1
Boa constrictor	KJ621419	Acaponeta	Sinaloa	Mexico	22351	-103314	x				1
Boa constrictor	KJ621420	El Naranjo	Colima	Mexico	19159	-104269	x				52
Boa constrictor	KJ621422	Manzanillo	Colima	Mexico	19101	-104295	x			x	93
Boa constrictor	KJ621423	Puerto Vallarta	Jalisco	Mexico	20676	-105239	x			x	123
Boa constrictor	KJ621426	Puerto Vallarta	Jalisco	Mexico	20733	-105295	x				123
Boa constrictor	KJ621431	Mascota	Jalisco	Mexico	18436	-103531	x				95
Boa constrictor	KJ621432	La Huerta	Jalisco	Mexico	19593	-105041	x				86
Boa constrictor	KJ621433	El Limón	Jalisco	Mexico	19807	-104918	x				50
Boa constrictor	KJ621435	Aquila	Michoacan	Mexico	18585	−103.558	x				7
Boa constrictor	KJ621436	Apatzingan	Michoacan	Mexico	19206	−102.614	x			x	6
Boa constrictor	KJ621438	Playa Azul	Michoacan	Mexico	18195	−103.053	x				119
Boa constrictor	KJ621439	Coalcomán	Michoacan	Mexico	18396	−103.509	x				40
Boa constrictor	KJ621442	Ayutla	Guerrero	Mexico	17142	−99.540	x				14
Boa constrictor	KJ621444	Atoyac	Guerrero	Mexico	17369	−100.200	x			x	13
Boa constrictor	KJ621445	Puerto Escondido	Oaxaca	Mexico	15898	−97.063	x			x	122
Boa constrictor	KJ621448	Huatulco	Oaxaca	Mexico	16650	−98.669	x			x	69
Boa constrictor	KJ621452	San Juan de los Cues	Oaxaca	Mexico	18068	−98.068	x				134
Boa constrictor	KJ621453	San Agustín Loxicha	Oaxaca	Mexico	15700	−96.5	x				132
Boa constrictor	KJ621454	Tlachicón	Oaxaca	Mexico	15724	−96.637	x			x	150
Boa constrictor	KJ621459	Pinotepa Nacional	Oaxaca	Mexico	16239	−97.792	x				115

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	KJ621461	Santiago Jamiltepec	Oaxaca	Mexico	15961	−97.376	x			x	136
Boa constrictor	KJ621464	El Camarón	Oaxaca	Mexico	16400	−95.650	x				48
Boa constrictor	KJ621465	Sto. Domingo Tehuantepec	Oaxaca	Mexico	16383	−95.268	x				143
Boa constrictor	KJ621467	Sierra Mazateca	Oaxaca	Mexico	18221	−96.687	x				141
Boa constrictor	KJ621468	Teotitlan del Camino	Oaxaca	Mexico	18247	−97.155	x			x	147
Boa constrictor	KJ621470	Huautla	Morelos	Mexico	18448	−98.987	x				70
Boa constrictor	KJ621473	El Cielo	Tamaulipas	Mexico	23045	−99.229	x				49
Boa constrictor	KJ621474	Barra del Tordo	Tamaulipas	Mexico	22913	−97.949	x				18
Boa constrictor	KJ621475	Ejido la Concepción	San Luis Potosí	Mexico	21688	−98.800	x				47
Boa constrictor	KJ621477	Los Chimalapas	Veracruz	Mexico	17159	−94.229	x				88
Boa constrictor	KJ621478	Boca del Río	Veracruz	Mexico	19106	−96.115	x			x	23
Boa constrictor	KJ621490	Centla	Tabasco	Mexico	18413	−92.919	x				39
Boa constrictor	KJ621494	Cd. Del Cármen	Campeche	Mexico	18227	−91.829	x				38
Boa constrictor	KJ621496	Cuxtal	Yucatán	Mexico	20911	−89.611	x			x	46
Boa constrictor	KJ621507	Cuxtal	Yucatán	Mexico	20911	−89.611	x				46
Boa constrictor	KJ621509	Piste	Yucatán	Mexico	20719	−88.610	x			x	118
Boa constrictor	KJ621510	Mérida	Yucatán	Mexico	20964	−89.616	x				98
Boa constrictor	KJ621518	Felipe Carrillo Puerto	Quintana Roo	Mexico	20.14	−88.301	x				60
Boa constrictor	KJ621519	El Triunfo	Chiapas	Mexico	15354	−92.589	x				56
Boa constrictor	KJ621520	Antigua	Guatemala	Guatemala	16048	−90.066	x				5
Boa constrictor	KJ621522	Asunción Mita	Guatemala	Guatemala	15962	−88.618	x			x	12
Boa constrictor	KJ621523	El Rosario	Zacapa	Guatemala	14972	−89.526	x				53
Boa constrictor	KJ621524	Escuintla	Izabal	Guatemala	15738	−88.579	x				56
Boa constrictor	KJ621525	Antigua	Guatemala	Guatemala	14616	−90.567	x				5
Boa constrictor	KJ621526	Bocas del Toro	Panama	Panama	9237	−82.342	x				24
Boa constrictor	KJ621527	Canal Zone	Panama	Panama	9101	−79.699	x				33
Boa constrictor	KJ621528	Barro Colorado	Panama	Panama	9333	−79.912	x				20
Boa constrictor	KJ621529	Paraíso	Panama	Panama	9031	−79.610	x				109

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor	KJ621530	Cayos Cochino Pequeño	Islas de la Bahía	Honduras	15958	−86.464	x				37
Boa constrictor	KJ621531	Isla De Roatan	Islas de la Bahía	Honduras	16315	−86.537	x				74
Boa constrictor	KJ621534	San Francisco Menéndez	Ahuachapán	El Salvador	13867	−89.983	x				133
Boa constrictor	KJ621535	Arambala	Morazán	El Salvador	13767	−88.129	x			x	8
Boa constrictor	KJ621536	Río Tortuguero	Limón	Costa Rica	10583	−83.517	x			x	127
Boa constrictor	KJ621537	Río Tortuguero	Limón	Costa Rica	10572	−83.517	x				127
Boa constrictor	KX150374	--	Venezuela	Venezuela	6.423749*	-66.58973*	x				159
Boa constrictor	KX150375	--	Cayo	Belize	1715428	-8867733	x				36
Boa constrictor	KX150377	--	Crawl Cay	Belize	16599068	-88219541	x				45
Boa constrictor	KX150378	--	Huehuetenango	Guatemala	15.587991*	-91.67607*	x				71
Boa constrictor	KX150381	--	Baja Verapaz	Guatemala	15.07875*	-90.41252*	x				17
Boa constrictor	KX150385	--	Lagoon Cay	Belize	16631967	-8820894	x				85
Boa constrictor	KX150399	--	Honduras	Honduras	15199999	-86241905	x				68
Boa constrictor	KX150402	--	Nicaragua	Nicaragua	12865416	-85207229	x				102
Boa constrictor	KX150403	--	El Salvador	El Salvador	13.794185*	-88.89653*	x				54
Boa constrictor	KX150409	--	Costa Rica	Costa Rica	9748917	-83753428	x				44
Boa constrictor	KX150410	--	Cayos Cochinos	Honduras	15.97212**	-86.4756**	x				36
Boa constrictor	KX150413	Malacaton, Finca San Ignacio	San Marcos	Guatemala	1494583	-92025	x				90
Boa constrictor	KX150417	--	Sonora	Mexico	29.297226*	-110.3309*	x				140
Boa constrictor	KX150428	Road from Comala toMinatitlan	Colima	Mexico	1931468	-10384741	x				41
Boa constrictor constrictor	EU273628	Iquitos	Loreto	Peru	--	--	x				73
Boa constrictor constrictor	EU273635	Tarapoto	San Martín	Peru	-6.496*	-76.37*	x				146
Boa constrictor constrictor	EU273654	Marajó	Pará	Brazil	-0.898*	-49.801*	x				94
Boa constrictor constrictor	GQ300896	--	Guyana	Guyana	4.872*	-58.951*	x				66
Boa constrictor constrictor	GQ300902	Iquitos	Loreto	Peru	--	--	x				73
Boa constrictor constrictor	EU273629	--	Guyana	Guyana	4.872*	-58.951*	x				66
Boa constrictor constrictor	EU273630	--	Surinam	Surinam	4.058*	-55.885*	x				144
Boa constrictor imperator	EU273616	Cancún	Quintana Roo	Mexico	21.157*	-86.886*	x				34

Espécie/Morfótipo	Voucher	Localidade	UF	País	Latitude	Longitude	Cytb	ND4	NTF3	ODC	Nº
Boa constrictor imperator	EU273618	--	Utila	Honduras	--	--	x				158
Boa constrictor imperator	EU273619	Tuxtla de Gutiérrez	Chiapas	Mexico	16.76*	-93.105*	x				153
Boa constrictor imperator	GQ300935	Cancún	Quintana Roo	Mexico	21.157*	-86.886*	x				34
Boa constrictor longicauda	EU273612	--					x				
Boa constrictor longicauda	KF576703**	--						x			
Boa constrictor nebulosa	KF57673**	--					x				
Boa constrictor nebulosa	KF576699**	--						x			
Boa constrictor nebulosa	KF576698**	--						x			
Boa constrictor occidentalis	EU273651	--	Argentina	Argentina	-34.999*	-64.923*	x				10
Boa constrictor occidentalis	GQ300916	--	Argentina	Argentina	-34.999*	-64.923*	x				10
Boa constrictor orophias	KF576734**	--					x				
Boa constrictor orophias	KF576703**	--						x			
Boa constrictor orophias	KF576701**	--						x			
Boa constrictor ortonii	KF576739**	--					x				
Boa constrictor sabogae	EU273665	--	Saboga Island	Panama	8.622**	-79.06**	x				129
Boa constrictor sabogae	KF576715**	--						x			
Boa constrictor sabogae	KF576714**	--						x			
*Charina bottae**	AF302975	--						x			
*Charina bottae**	AY099986	--					x				
*Corallus batesii**	KC750019	--						x			
*Corallus caninus**	JX576183	--							x		
*Corallus hortulanus**	HM348868	--					x				
*Epicrates cenchria**	HQ399501	--					x				
*Epicrates cenchria**	KC329975	--							x		
*Eunectes murinus**	JX576187	--							x		
*Eunectes murinus**	U69808	--					x				
*Eunectes notaeus**	JN967416	--						x			

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído de fragmentos de fígado, escama ou muda das serpentes, segundo o método descrito por Walsh *et al.* (1991), com adaptações, utilizando Chelex 5%.

Para isso, os tecidos preservados em álcool foram retirados e pressionados em papel absorvente até secar completamente. Depois, um pedaço pequeno do tecido foi retirado e depositado em tubos eppendorfs de 1,8 ml contendo 500 µL de uma solução composta por 2,25 g Chelex em 45 ml de água destilada. Em seguida, foram adicionados 10 µl de proteinase K (20 mg/mL) em cada tubo. Entre a retirada de uma amostra de tecido e outro, os instrumentos foram limpos em formol, mergulhados em ácool e flambados em lamparina para esterilizar.

Os tubos foram colocados em plataforma com agitador em estufa por 24 horas para fígado e 48 horas para escama, a temperatura de 56ºC. Após decorrido este período, os tubos foram retirados da estufa e agitados delicadamente por aproximadamente 15 segundos. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 95-100ºC em banho seco por 15 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm (centrífuga Tomy MRX152) por 5 minutos. Após a precipitação do Chelex, cerca de 200 a 300 µl do sobrenadante forma retirados e transferidos para novos tubos de 1,5 ml identificados com os números das respectivas amostras. Após a extração, a quantidade DNA foi mensurada utilizando-se o equipamento Nanodrop (Nano Drop ND-2000c acoplado ao programa ND-2000 v. 3.3.0).

3.2.2 Amplificação de fragmentos dos genes de interesse

Neste trabalho, ao todo, foram utilizados quatro marcadores para análises, sendo dois mitocondriais, gene para o citocromo b oxidase (Cytb) e para o NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4); e dois marcadores nucleares, gene para a neurotrofina 3 (NTF3) e íntron do gene para a ornitina decarboxilase (ODC), cujos *primers* utilizados para amplificação estão listados na Tabela 4. Os tamanhos esperados dos fragmentos eram de aproximadamente 1000 pb para o Cytb, 640 pb

para o ND4, 590 pb para o NTF3 e 500 pb para ODC. Os reagentes e suas respectivas quantidades e concentrações para as reações em cadeia da polimerase (PCR) estão listados na Tabela 5.

Para a amplificação dos fragmentos de interesse, foram empregados protocolos diferentes para Cytb, ND4, ODC e NTF3. A amplificação dos fragmentos dos genes mitocondriais foi realizada em termociclador Eppendorf AG 22331 Hamburg. Os regimes de temperatura e ciclos empregados estão sumarizados na Tabela 6.

A verificação da qualidade dos produtos de PCR e tamanho das bandas amplificadas foi feita em gel de agarose 1% (0,3 g de agarose em 30 ml de TAE), fundida em forno microondas com potência alta por 60 segundos. A solução do gel foi depositada na forma ainda líquida no suporte da cuba de eletroforese. Após a solidificação, deu-se o prosseguimento de aplicação de 1 µl de cada uma das amostras misturadas com 1 µl de solução de azul de bromofenol, *BlueJuice* (Invitrogen) e 1 µl de gel red (Biotium) diluído (1:500). O marcador de peso molecular utilizado foi o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 60 V, 150 mA, por 30 minutos. O gel foi analisado em transiluminador ultravioleta Alpha Innotech e sistema de captura de imagem Alpha DigiDoc RT2.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com 0,5 µL da enzima Exonuclease I de *E. coli* (Exo), 20 U/µL, e 1,0 µL de Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP), 1 U/µL (Fermentas), para cada 13 µL de produto de PCR, a 37ºC por 15 minutos e 80ºC por 15 minutos. Para cada amostra a ser sequenciada, são incluídos: 6 µL da amostra de DNA a 20 ng/µL; 1 µL de *primer* a 2,5 µM; 3 µL de tampão (200 mM TrisHCl pH 9.0 com 5mM $MgCl_2$); 1 µL de “Big Dye V3. 1” (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart - Applied Biosystems).

Os sequenciamentos foram realizados parte no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, em sequenciador automático (3100 *Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) e outra parte na empresa MACROGEN (3730XL *Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) (Seul, Coréia).

Tabela 4 - *Primers* utilizados para amplificação dos fragmentos do Cytb, ND4, NTF3, ODC.

Gene	*Primer*	Cadeia	Sequência	Referência
Cytb	L14910	L	GACCTGTGATMTGAAAACCAYCGTTGT	Burbrink *et al*.(2000)
Cytb	H15149	H	CTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTA	Burbrink *et al*.(2000)
ND4	ND4	L	CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC	Arévalo *et al*.(1994)
ND4	LEU	H	CATTACTTTTACTTGGATTTGGACCA	Arévalo *et al*.(1994)
NTF3	NTF3 F3	L	ATATTTCTGGCTTTTCTCTGTGGC	Noonan e Chippindale(2006a)
NTF3	NTF3 R4	H	GCGTTTCATAAAAATATTGTTTGACCGG	Noonan e Chippindale(2006a)
ODC	ODCF	L	GACTCCAAAGCAGTTTGTCGTCTCAGTGT	Noonan e Chippindale(2006a)
ODC	ODCR	H	TCTTCAGAGCCAGGGAAGCCACCACCAAT	Noonan e Chippindale(2006a)

Tabela 5: Reagentes utilizados na amplificação dos fragmentos de interesse e suas respectivas quantidades (concentrações entre parênteses). dNTPs = dexorribonucleotídeos, mM = milimolar, $MgCl_2$ = Cloreto de Magnésio, Taq = Taq polimerase *Platiun*, U/µL = unidades por microlitro, VF = Volume final.

GENE	REAGENTES								
	dNTPs (10mM)	**Tampão – $MgCl_2$**	**$MgCl_2$**	**primer1 (5mM)**	**primer 2 (5mM)**	**Taq (5U/µL)**	**H_2O**	**DNA**	**VF**
Cytb	0,5µL	2,5 µL	3µL (50 mM)	4 µL	4 µL	0,2	13,8	2	30
ND4	0,5 µL	2 µL	2,5µL (25mM)	0,6 µL	0,6 µL	0,2	15,6	3	25
NTF3	0,5 µL	1,4 µL	2,5µL (50mM)	0,6 µL	0,6 µL	0,2	16,5	3	25
ODC	0,5 µL	2 µL	2,5µL (50mM)	0,6 µL	0,6 µL	0,2	15,6	3	25

Tabela 6: Regimes de temperatura e ciclos empregados para a amplificação dos fragmentos de interesse.

GENE	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Extensão Final
ND4	94°C/3min	40 x 94°C/3s	48°C/45s	72°C/30s	72°C/10min
NT3	94°C/3min	40x 94°C/3s	46°C/45s	72°C/30s	72°C/10min
Cytb	94°C/2,5min	5x 94°C/30s	62°C/30s	72°C/90s	72°C/10min
		10x 94°C/30s	58°C/30s	72°C/90s	
		20x 94°C/30s	55°C/30s	72°C/90s	
ODC	94°C/2,5min	5x 94°C/30s	62°C/30s	72°C/90s	72°C/10min
		10x 94°C/30s	58°C/30s	72°C/90s	
		20x 94°C/30s	55°C/30s	72°C/90s	

3.2.3 Análise e edição das sequências

Os arquivos gerados pelo sequenciador, contendo as sequências e seus respectivos eletroferogramas, foram analisados no programa CodonCode Aligner 6.0.2 (LI-COR Inc). A pesquisa comparativa de similaridade foi realizada por Blast*n* (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) para conferir se os fragmentos em questão correspondem, de fato, à sequência alvo e se não ocorreram eventuais contaminações.

Os alinhamentos múltiplos das sequências geradas juntamente com as sequências disponíveis nos bancos de dados foram realizados *online* no programa MAFFT (Multiple Alignment with Fast Fourier Transform) versão 7 (disponível em: http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/) (Katoh & Standley, 2013) e depois conferidos visualmente. Para os genes codificantes, foi conferida a tradução dos códons em aminoácidos para checagem de eventuais alterações no quadro de leitura ou códons de parada.

3.2.4 Construção das matrizes

Foram construídas oito matrizes ao total, sendo quatro formadas pelos genes individuais e quatro formadas por concatenações. A Tabela 7 resume as diferentes combinações realizadas, o número de indivíduos presentes em cada uma das matrizes e o número de pares de bases. Essas matrizes foram utilizadas para a realização das análises filogenéticas e de delimitação de espécies. Os alinhamentos foram editados de modo a eliminar ou reduzir ao máximo a quantidade de *gaps*.

Tabela 7: Matrizes construídas para a realização das análises filogenéticas. A primeira coluna indica o(s) gene(s), a segunda coluna indica o número de sequências presentes na matriz e a terceira coluna ,o número de pares de bases. Sítios conservaos, variantes e informativos são também mostrados

MATRIZ	Nº seq	Nº pb	NºSítios conservados	NºSítios variantes	NºSítios informativos
CYTB	151	744	441	303	196
ND4	82	600	405	195	128
NTF3	78	506	457	49	28
ODC	114	508	447	61	38
CYTB/ND4	61	1261	938	323	183
CYTB/ODC	81	1266	952	314	198
NTF3/ODC	66	1050	989	61	30
4GENES	54	2305	1976	329	184

3.2.5 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se os métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB).

As análises de MP foram conduzidas no programa TNT 1.1 (Goloboff *et al*., 2008) (disponível em http://www.phylogeny.fr/index.cgi), com *new technology search* com os seguintes algoritmos: *Random Sectorial Searches*, *Consensus-Based Sectorial Searches* e *Treefusing* (modo padrão), com 1000 réplicas de *bootstrap.*

As análises de MV e o teste de *bootstrap* foram realizadas *online* no programa RaxML (Stamatakis, 2014), na plataforma CIPRES (*Cyberstructure for Phylogenetic Research*) (https://www.phylo.org), empregando o modelo de evolução GTRCAT para as análises individuais de cada marcador, com 1000 réplicas de *bootstrap.* Este modelo foi escolhido porque requer menor tempo computacional (Izquierdo-Carrasco *et al*., 2011; Frazão *et al*., 2015; Selvatti *et al*., 2015).

Para a realização das análises de IB, inicialmente foi feita uma busca do melhor modelo de substituição para os marcadores, realizada no programa MEGA v.7.0 (Kumar *et al*., 2016). Foram testados 24 modelos, para os quais foram calculados: BIC (Critério de Informação Bayesiano), AICc (Critério de Inormação de Akaike, corrigido), *In*L (valor de Máxima Verossimilhança) sendo escolhido o modelo de menor valor de BIC e de maior valor de verossimilhança. Os modelos indicados

como melhores para cada gene foram, respectivamente: Cytb = GTR+G+I; ND4 = HKY+G+I; NTF3 = T92+G e ODC = T92.

Cada análise de IB foi executada *online* na plataforma CIPRES (https://www.phylo.org), utilizando simultaneamente duas corridas com quatro cadeias de dez milhões de gerações cada. As cadeias de Markov (MCMC) foram amostradas a intervalos de 1.000 gerações e ao final descartadas 25% das primeiras árvores geradas. As probabilidades posteriores foram determinadas com base na topologia consenso de 50% das árvores geradas, após confirmada a convergência das cadeias. No caso das matrizes concatenadas, o conjunto de dados foi particionado para a atribuição do modelo respectivo para cada marcador.

3.2.6 Análise de Delimitação de Espécies (ADE)

Para a análise de delimitação de espécies foram empregados dois métodos: por bPTP (*Bayesian implementation of the Poisson Tree Process*) (Zhang *et al*., 2013) e GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*) (Pons *et al*., 2006). Ambos empregam a delimitação *a posteriori* de grupos e utilizam uma árvore de entrada enraizada, sendo que no bPTP a árvore pode não ser ultramétrica e no GMYC a árvore tem que ser ultramétrica e totalmente bifurcada.

Estes métodos calculam os eventos de especiação com base no número de substituições, dada a topologia da árvore de entrada.

Desde que os comprimentos dos ramos representem substituições por sítio, qualquer árvore filogenética pode ser utilizada como árvore de entrada. Nesse caso, somente as árvores construídas por Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana puderam ser utilizadas. As topologias obtidas por Parcimônia foram descartadas.

Para bPTP, embora tenham sido construídas 8 matrizes (Tabela 7), uma vez que a árvores de Cytb foi a mais resolutiva e a de 4Genes engloba indivíduos contemplados neste trabalho, foram escolhidas para serem as árvores de entrada em bPTP, sendo duas de Cytb (MV e IB) e duas de 4Genes (MV e IB), totalizando quatro árvores de entrada.

A metodologia bPTP, foi inicialmente descrita para análises unilócus, mas neste trabalho foi utilizada também para as matrizes multilócus, uma vez que há emprego semelhante na literatura (Cottontail *et al*., 2014). A análise de bPTP foi

realizada no servidor do programa, disponível em http://species.h-its.org/ptp/, sob os seguintes parâmetros: 500.000 gerações de MCMC (número limite de gerações que podem ser calculadas pelo servidor), corte a cada 100 gerações e descarte de 25% das árvores iniciais.

Para de GMYC, foi utilizada a árvore obtida através da análise de tempo de divergência (referente ao marcador Cytb) como árvore de entrada, e a análise foi conduzida no servidor do programa, disponível em http://species.h-its.org/ptp/, sob o parâmetro de *single threshold*.

3.2.7 Estimativa dos Tempos de Divergência

A estimativa dos tempos de divergência foi calculada utilizando-se o programa BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.,* 2012) no portal CIPRES (https://www.phylo.org). O arquivo com os dados e comandos foi criado através da interface gráfica BEAUTi 1.8.2 (Drummond *et al.,* 2012). A matriz de Cytb foi escolhida por ser aquela com o maior número de amostras e para a qual possuíamos taxa de mutação conhecida (0.0124 mutações por sítio por milhões de anos, empregada por Suárez-Altilano *et al*., 2014). O modelo empregado foi GTR+G+I, com relógio molecular relaxado e com taxas normal não relacionadas. Não foi utilizada árvore guia e foram feitas 50.000.000 gerações, com 10% de descarte das árvores iniciais.

3.2.7.1 Pontos de Calibração

Foram utilizados cinco pontos de calibração, escolhidos *a priori* de acordo com a filogenia obtida para o marcador, empregando distribuição lognormal. Nesses pontos, foram utilizados fósseis conhecidos para o grupo. Os fósseis utilizados para calibrar os pontos 3, 4 e 5 não tiveram idades específicas descritas, de modo que empregamos a média do período do estrato onde o fóssil foi encontrado.

1) A raiz; para este ponto foi utilizado o fóssil de *Titanoboa* (Head *et al*., 2009), com média de 60 Ma e desvio padrão = 1.2;

2) Um ponto no grupo externo representado por *Corallus,* baseado no ponto de calibração descrito por Head *et al*. (2015), com média de 58.1 Ma e desvio padrão = 3.6;

3) O ponto para o ínicio da diversificação de *Boa*, representado pelo fóssil descrito por Albino (1993), com média de 44.95 Ma (Eoceno, 56 - 33.9 Ma) e desvio padrão = 6.8;

4) O ponto que representa a linhagem do México, empregando-se o fóssil descrito por Miller (1980), com média de 3.05 Ma (Plioceno tardio, 3.6 – 2.5 Ma) e desvio padrão = 0.3;

5) O ponto que separa a linhagem de *Boa constrictor occidentalis* e as outras amostras da América do Sul, para este ponto foi incluído o fóssil da Patagônia, descrito por Albino & Carlini (2008), com média de 0.4 Ma (Pleistoceno tardio, 0.8 – 0.011 ka) e desvio padrão = 0.18.

4 RESULTADOS

O presente trabalho apresenta a cobertura mais abrangente em termos de número de localidades e domínios morfoclimáticos para a região neotropical, englobando 9 dos 10 domínios morfoclimáticos descritos por Morrone (2014) (Tabela 2, Figura 4).

4.1 Análises Filogenéticas

Boa constrictor foi recuperada como um grupo monofilético com elevados valores de suporte (MP = 100, MV = 100, IB = 1) nas análises utilizando sequências do Cytb (Figuras 5 a 7), ND4 (Figuras 8 a 10), Cytb + ND4 (Anexos 1 a 3), Cytb + ODC (Anexos 4 a 6) e 4Genes (Cytb + ND4 + ODC + NTF3 concatenados) (Figuras 11 a 13), com exceção de MP para ND4 (Figura 8), uma vez que *Corallus batesii, Eunectes notaeus* e *E. murinus*, representantes do grupo externo, foram recuperados juntamente com *Boa*.

As análises individuais dos genes NTF3 e ODC, bem como ODC + NTF3 não se mostraram resolutivas, devido à quantidade de politomias recuperadas (dados não mostrados).

A árvore de Cytb foi a mais resolutiva, pois o sinal filogenético do Cytb foi o melhor para o grupo e além disso, a sua matriz é composta pelo maior número de indivíduos e maior representatividade em termos de distribuição espacial do gênero *Boa*. A árvore 4Genes apresenta representantes exclusivamente sul-americanos, no entanto com a maior quantide de pares de bases.

Dessa forma, nas análises do marcador Cytb em MP, MV e IB foram recuperados 9 grupos, nomeados de A a I, além do grupo externo, embora nem todos os grupos tenham apresentado valores de suporte significativos (bootstrap >70 e probabilidade posterior >95).

O clado A engloba exclusivamente indivíduos do México (MP = 90, MV = 82, IB = 1). Neste grupo foi recuperado um indivíduo identificado como pertencente ao morfótipo de *B. c. imperator* (Cancun, México), o restante dos indivíduos deste clado não foram identificados ao nível de subespécie.

O clado B, que reúne indivíduos do México, América Central e costa pacífica da América do Sul (MP = 75, MV = 79, IB = 0,99), englobando indivíduos

identificados como pertencentes aos morfótipos *B. c. imperator* (Cancun, México; Utila, Honduras; Tuxtla de Gutierrez, México), *B. c. longicauda* (Tumbes, Peru e EU273612), *B. c. sabogae* (Ilha Saboga, Panamá), *B. c. ortonii* (El Mango, Equador, e KF576739) e *Boa constrictor*.

Os clados C e D foram recuperados como irmãos (MP = 22, MV = 65, IB = 0,96). O clado C (MP = 71, MV = 93, IB = 1) compreende indivíduos distribuídos na região amazônica, representados pelo do morfótipo de *B. c. constrictor* (Iquitos e Tarapoto do Peru, Guiana e Suriname) e animais da Venezuela identificados até o nível de espécie.

O clado D (MP = 44, MV = 88, IB = 0,96), é formado pelos subclados D1 e D2, onde D1 recupera indivíduos de *B. constrictor* de Nova Brasília (RO), Vitória do Xingu, Melgaço e Belém (PA), além de *B. c. constrictor* da Ilha de Marajó, também no Pará; D2 recupera indivíduos de Porto Trombetas (PA), Lago Chaviana e Arumã (AM) e UHE Jirau (RO), além de um indivíduo de *B. c. constrictor* de Iquitos, Peru (GQ300902) e *B. c. melanogaster* de Orellana, Equador (QCZAR6476).

O clado E (MP = 36, MV = 48, IB = 0,79) representa o maior agrupamento da porção sul do continente americano, englobando, além de exemplares identificados apenas como *Boa constrictor,* distribuídos por todo o território brasileiro (nos Estados de Rondônia, Pará, São Paulo, Mato Grosso, Tocantins, Minas Gerais, Acre, Brasília e Goiás), indivíduos identificados com os morfótipos de *B. c. amarali* (de São Paulo e Minas Gerais) e *B. c. constrictor* (do Maranhão, Mato Grosso e da Guiana). O indivíduo LCBL12 (Manaus, AM), foi recuperado no clado E nas análises de MV e IB, ao passo que em MP foi recuperado fora deste grupo.

O clado F (MP = 17, MV = 82, IB = 0,59) reúne indivíduos distribuídos do Rio Grande do Norte, Bahia, Alagoas, Rio de Janeiro, São Paulo e Goiás, além de *B. c. constrictor* (de Cachoeiro do Itapemirim, ES; Salvador, BA; Teresina, PI) e *B. c. amarali* (Babaçulândia, TO).

Os clados G e H são recuperados como grupos irmãos (MP = 80, MV = 96 e IB = 0.89), sendo ambos representados por um único exemplar, respectivamente, o clado G por *B. c. orophias* e o clado H por *B. c. nebulosa*.

O clado I (MP = 97, MV = 99, IB = 1) é composto exclusivamente por indivíduos de *B. c. occidentalis*.

Nas três análises, um indivíduo de *B. constrictor* (CHUNB61848) de Piripiri (PI) não é recuperado dentro de nenhum clado.

As relações entre os clados A a I recuperadas, com base no Cytb, sâo apresentadas abaixo.

Nas três análises, os grupos A e B foram recuperados como irmãos (MP = 48, MV = 82, IB = 0,99). Em MP, A+B foi recuperado separado dos grupos C a I, mostrando uma separação entre Norte (México, América Central e porção trans-Andina do Peru e do Equador) e Sul (Brasil, Guiana, Suriname, Venezuela, Argentina, e porção cis-Andina do Peru e do Equador). Em MV e IB esta separação entre Norte e Sul não foi recuperada: em MV, A+B foi recuperado como grupo irmão de E (MV = 7); em IB, A+B foi recuperado como grupo irmão de I (*B. c. occidentalis*), sem suporte. Em MV, os agrupamentos mostraram-se em uma ordem do mais externo para o mais interno, onde G e H são irmãos, G+H é irmão de F, ((G+H)+F) é irmão de I, (((G+H)+F)I) é irmão de CHUNB61848 de Piripiri (PI), (((G+H)+F)I)Piripiri) é irmão de C+D, ((((G+H)+F)I)Piripiri)C+D) é irmão de (G(A+B)). Em IB, os grupos C+D, E, F, G+H e Piripiri foram recuperados em uma politomia (Figura 7).

Apesar de a composição dos clados A a I não ser a mesma nas análises com os outros marcadores (Cytb + ND4, Cytb + ODC, ND4, 4Genes) em decorrência da disponibilidade das sequências nas matrizes (Tabelas 2 e 3), a nomeação de A a I será utilizada para os resultados dos outros marcadores - conforme apresentado a seguir para as análises com ND4 (Figuras 8, 9 e 10) e com os 4 genes concatenados (Figuras 11, 12 e 13) e para os demais marcadores nos Anexos 1 a 6.

Para ND4, foi obtido resultado semelhante ao Cytb, para os agrupamentos A a I: A+B (MP = 99; MV = 99, IB = 1), sendo que do grupo A o único indivíduo presente nessa matriz é UVM57, identificado como pertencente ao morfótipo *B. c. imperator*, procedente da Sierra Tarahumara (México) e em B, temos indivíduos de temos *B. c. imperator, B. c. longicauda* e *B. c. sabogae*; em E (MP = 99, MV = 50, IB = 1), um indivíduo identificado como *B. c. constrictor*, procedente de Trindade e Tobago; em F (MP = 34, MV = 76, IB = 0,93), temos indivíduos dos morfótipos *B. c. constrictor* e *B. c. amarali*; I (MP = 99, MV = 95, IB = 1), composto exclusivamente por *B. c. occidentalis*; G representado por *B. c. orophias* e H representado por *B. c. nebulosa* (MV =100, IB = 1). Nesta matriz ocorreu a recuperação de um grupo composto por indivíduos dos clados C + D. Para este

marcador, a separação em Norte e Sul foi obtida em MP e IB. Em MP, I é grupo irmão de um politomia formada por C+D, E, F, G e H. Em MV, a topologia foi semelhante que em Cytb, mas a relação entre os grupos foi diferente: o grupo mais externo é formado por uma mistura de indivíduos de C+D, e onde o indivíduo de Piripiri foi recuperado; em seguida temos um outro grupo misto, mas com indivíduos de D+E; A+B é irmão de I, ((A+B)I) é irmão de F, (((A+B)I)F) é irmão de G+H, ((((A+B)I)F)G+H) é irmão de E. Em IB, A+B é grupo irmão de uma politomia formada por C+D, D+E, E, F, I e G+H (Figuras 8, 9 e 10).

A matriz que reúne os quatro marcadores (4Genes), é composta apenas por indivíduos da porção sul do continente. Nesta análise, *B. c. longicauda* é recuperada como grupo irmão de todos os outros em MP e IB. Nas três análises foram recuperados os clados D (MP=64; MV= 74 incluindo + um indivíduo de E; IB= 92 + um indivíduo de E), F (MP= 95, MV= 87, IB= 0,99) e I (MP= 100, MV= 99, IB= 1). Em MP, os representantes do grupo E são recuperados em uma politomia. Em MP e IB, I é recuperado como grupo irmão de F, mas em MV, como grupo irmão de ((D+um indivídio de E) *B. c. longicauda*)(E)) (Figuras 11, 12 e 13).

Houve recuperação de indivíduos procedentes de uma mesma localidade em clados distintos. Nas análises correrpondentes à matriz de Cytb, a sequência EU273628 é recuperada no clado C e a sequência GQ300902 no clado D, cuja localidade está registrada como Iquitos (Peru); a sequência EU273639, recuperada no clado C, e a sequência GQ300896, recuperada no clado E, ambas registradas como originárias da Guiana. Todas estas sequências são procedentes do *GenBank*, derivadas do trabalho Hynková *et al*. (2009). As amostras oriundas de Babaçulândia (TO), MTR7733 (identificada como *B. c. constrictor*) e MTR7659 (identificada *como B. c. amarali*), foram recuperadas, respectivamente, nos clados E e F (em ND4 - Figuras 8 a 10). As amostras provenientes de Piracicaba, LCBL15 (4Genes) e LCBL16 (ND4, Cytb+ND4, Cytb+ODC - Anexos 1 a 6), foram recuperadas no clado E e a amostra LCBL17 foi recuperada no clado F (em Cytb). As amostras de Manaus, LCBL13 (Cytb+ND4) e LCBL14 (ND4) foram recuperadas no clado D, enquanto que a amostra LCBL12, também de Manaus, foi recuperada no clado E (Cytb).

A seguir, serão descritos os resultados que se encontram nos Anexos 1 a 6.

Para a matriz concatenada de Cytb + ND4 (Anexos 1, 2 e 3), nas três análises foram recuperados os agrupamentos D (MP = 64, MV = 74, IB = 0,99); F (MP =89, MV = 89, IB =1), reunindo indivíduos identificados como pertencentes aos morfótipos *B. c. constrictor* e *B. c. amarali*; e I (MP =100, MV =100, IB =1), formado exclusivamente por *B. c. occidentalis*. O clado E foi recuperado em MV e IB (MV = 18, IB = 1), onde agrupa indivíduos identificados como pertencentes aos morfótipos *B. c. constrictor* e *B. c. amarali*; porém em MP apenas um clado interno composto de exemplares de Minas Gerais e São Paulo foi recuperado, no qual estão reunidos indivíduos de *B. c. amarali*, sendo que o restante dos indivíduos do clado E não foram recuperados de forma resolvida. Em MV e IB, o indivíduo identificado como *B. c. longicauda* (CORBIDI3790, Peru) é recuperado como grupo irmão de todos os outros agrupamentos, mas em MP este indivíduo foi recuperado como grupo irmão de I (*B. c. occidentalis*). Em MV e IB, as relações entre os grupos são similares: F é irmão de D+E, e este grupo (F(D+E)) é irmão de I.

Os resultados de Cytb + ODC (Anexos 4, 5 e 6) foram similares aos de Cytb, recuperando os agrupamentos: A (MP = 99, MV = 100, IB = 1); B (MP = 97, MV= 92, IB = 1), que reune as subespécies *B. c. longicauda* e *B. c. ortonii*; D (MP = 70, MV = 91, IB = 0.87), onde foi recuperado um indivíduo identificado como sendo do morfótipo *B. c. melanogaster* (QCZAR6476, Orellana, Equador); E (MP = 99, MV = 100, IB = 1), reúne indivíduos pertencentes aos morfótipos *B. c. constrictor* e *B. c. amarali*; F (MP = 34, MV = 71, IB = 0,96), que agrupa indivíduos pertencentes aos morfótipos *B. c. constrictor* e *B. c. amarali*; e G (MP = 99, MV = 100, IB = 1), que é composto exclusivamente por *B. c. occidentalis*. A única amostra do subclado C presente nesta matriz é um indivíduo de Falcón (Venezuela), que em MV e IB é recuperado como grupo irmão de D, e em MP é recuperado como grupo irmão de todos os agrupamentos. A separação entre norte e sul foi observada apenas em MV, onde (A+B) é grupo irmão de (((E)(C+D)F))I), onde I é grupo irmão de todos os outros grupos do sul. Já em IB e MP, G é recuperado como grupo irmão de A+B. Em MP, D é o grupo mais externo, sendo irmão de ((F)((E)((A+B)I)). Em IB, temos ((A+B)I) irmão de (E(F(C+D))).

4.2 Análises de Delimitação de Espécie

As análises de delimitação de espécie foram feitas com base na matriz de Cytb e de 4Genes. A matriz de Cytb foi escolhida porque possui a maior representatividade de táxons para este marcador e porque se mostrou mais resolutiva. A matriz 4Genes foi escolhida porque é a que possui o maior número de pares de bases (Figuras 14 a 17).

4.2.1 bPTP

Para cada uma das quatro árvores de entrada foi gerada uma árvore final, onde se mostra, nos nós, o valor de suporte bayesiano, correspondendo às árvores de entrada de MV e IB de Cytb e 4Genes (Figuras 14 a 17).

Nas análises aqui apresentadas, o número de Espécies Putativas (EP) delimitadas pelo método bPTP, variou de acordo com a árvore de entrada utilizada, sendo o mínimo estimado em 15 EPs para os quatro genes concatenados com base na árvore de MV e o máximo estimado de 75 EPs para Cytb com base na árvore de IB (Tabela 8). Os resultados detalhados de delimitação estão apresentados nos Anexos 7 a 10.

Tabela 8: Comparação entre o número de Espécies Putativas, o número de pares de base e o número de sequências em cada matriz. No número de espécies putativas mostrado os grupos externos não foram incluídos.

MATRIZ	Nº sequências	Nº pares de base	NºEPs/ Árvore de entrada	
			MV	IB
CYTB	151	744	55	75
4GENES	54	2305	15	36

Em todas as árvores de entrada testadas, *Boa constrictor* não foi recuperada como uma única Espécie Putativa.

Para os exemplares que possuíam identificação ao nível de subespécie e para os quais havia mais de uma sequência, os únicos onde

todas as sequências foram agrupadas como fazendo parte de uma mesma EP foram as identificadas como *Boa constrictor occidentalis* (Figuras 14 a 17 e Anexos 7 a 10). Para as sequências que posuíam identificação ao nível de subespécie *Boa constrictor orophias* e *Boa constrictor nebulosa* e que eram únicas, cada uma foi apontada como uma EP distinta.

4.2.1.1 Relações obtidas para a árvore de entrada de Cytb/MV

As sequências identificadas como *Boa constrictor amarali* não foram agrupadas como uma única EP, estando distribuídas em quatro EPs diferentes. Em uma destas EPs, ocorre o agrupamento de uma *Boa constrictor amarali* (MTR7659 de Babaçulândia, TO) com *Boa constrictor constrictor* (MBIB4038 de Teresina, PI). Em outra EP, foram agrupadas quatro sequências de *Boa constrictor amarali* (de Minas e São Paulo) (Figura 14, Anexo 7).

As sequências identificadas como *Boa constrictor constrictor*, além daquela recuperada com *Boa constrictor amarali,* foram distribuídas em mais cinco EPs diferentes, totalizando seis EPs.

As sequências previamente identificadas como *Boa constrictor imperator* foram distribuídas em quatro EPs diferentes, com outros indivíduos que não possuíam identificação ao nível de subespécie.

As sequências identificadas como *Boa constrictor longicauda* foram distribuídas em duas EPs diferentes, sendo que em uma destas EPs, a mesma encontra-se agrupada com *B. c. ortonii* e na outra EP encontra-se agrupada com *B. c. sabogae*.

A sequência identificada como *B. c. melanogaster* foi agrupada em uma EP, juntamente com outras sequências sem identificação de subespécie.

As sequências identificadas como *Boa constrictor nebulosa* e *Boa constrictor orophias* são únicas, e foram apontadas cada uma como uma EP distinta.

4.2.1.2 Relações obtidas para a árvore de entrada de Cytb/IB

As sequências identificadas como *Boa constrictor amarali* estão distribuídas em três EPs diferentes, em uma delas, ocorre o agrupamento de

uma *Boa constrictor amarali* (MTR7659, Babaçulândia, TO) com *Boa constrictor constrictor* (MBIB4038, Teresina, PI). Além desse agrupamento, as sequências identificadas como *Boa constrictor constrictor*, foram distribuídas em outras sete EPs diferentes, uma das quais agrupa com uma *B. c. melanogaster* (Figura 15, Anexo 8).

As sequências identificadas como *Boa constrictor imperator* foram distribuídas em quatro EPs diferentes .

As sequências identificadas como *Boa constrictor longicauda* foram distribuídas em duas EPs diferentes, sendo que em uma delas encontra-se agrupada com *B. c. ortonii*.

A sequência identificada como *B. c. melanogaster* foi agrupada em uma EP, juntamente com outras sequências sem identificação de subespécie.

As sequências identificadas como *Boa constrictor nebulosa* e *Boa constrictor orophias* são únicas, e foram apontadas cada uma como uma EP distinta.

A única sequência identificada como *B. c. sabogae* foi apontada como uma EP.

4.2.1.3 Relações obtidas para as árvores de entrada de 4Genes

Para a árvore de entrada de MV (Figura 16, Anexo 9), as sequências identificadas como *Boa constrictor amarali* foram agrupadas como em três EPs diferentes, sendo um agrupamento com *Boa constrictor constrictor*. A única sequência identificada como *Boa constrictor longicauda* foi apontada como uma EP distinta.

Para a árvore de entrada de IB (Figura 17, Anexo 10), as sequências identificadas como *Boa constrictor amarali* foram agrupadas em sete EPs distintas, uma das quais com *Boa constrictor constrictor*.

Além desse agrupamento com *Boa constrictor amarali*, as sequências identificadas como *Boa constrictor constrictor* foram agrupadas em duas outras EPs. A única sequência identificada como *Boa constrictor longicauda* foi apontada como uma EP distinta.

4.2.2 GMYC

De acordo com a análise de GMYC, foram recuperadas 4 EPs diferentes. Uma corresponde às amostras da porção sul e das ilhas caribenhas (grupos C, D, E, F, G, H e I na filogenia de Cytb); abrangendo as subespécies *B. c. amarali*, *B. c. constrictor, B. c. melanogaster, B. c. nebulosa, B. c. occidentalis* e *B. c.orophias.* A segunda EP corresponde ao agrupamento A na filogenia, onde um indivíduo de *B. c. imperator* (GQ300935, Cancun, México) é agrupado com outros indivíduos sem identificação ao nível de subespécie. A terceira EP corresponde ao agrupamento B na filogenia e reúne as subespécies *B. c. imperator, B. c. longicauda, B. c. ortonii* e *B. c. sabogae*. A quarta EP é representada por uma única amostra do México (Sinaola/México) (Figura 18).

4.3 Análise de Tempos de Divergência

Na filogenia obtida com base na análise de tempo de divergência (Figura 19), houve uma separação entre as amostras provenientes da porção Norte daquelas da porção Sul. As amostras de *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias* foram recuperadas como grupo irmão das amostras de *B. c. occidentalis* (Probabilidade Posterior =1). Na porção Norte, os grupos A e B são recuperados como irmãos (PP = 1). Na porção Sul, as relações entre os grupos foram as seguintes: ((E(Piripiri ((C+D)F))(G+H)I))), onde E (PP = 0,96), (PP = 1); C (PP =1), D (PP =1), C + D (PP =0,95); F (PP = 0,6), F + (C + D) (PP = 0,03); I (PP = 1), G+H (PP = 1), I + (G+H) (PP = 0,37); (I (G+H)) irmão de ((C+D)F)) (PP = 0,11). As relações de recuperação das subespécies foram similares àquelas descritas para as análises filogenéticas para Cytb (Figuras 5 a 7).

As análises estimaram que a origem de *Boa* tenha ocorrido por volta de de 59.7 Ma (95% HPD = 57.47 – 61,49), no Paleoceno; seguida da separação das amostras provenientes das porções Norte e Sul do continente que ocorreu por volta de 34.24 Ma (95% HPD = 17.87 – 49.49) entre o Eoceno e o Mioceno. Na porção Norte, a separação entre os grupos A e B ocorreu por volta de 5,28 Ma (95% HPD = 2,65 – 12,81), no Neógeno, entre o Mioceno e o Plioceno. Na porção Sul, a diversificação entre os agrupamentos C, D, E, F, G, H e I iniciou-

se por volta de 0,9 Ma (95% HPD = 0,5 – 2,16), no Pleistoceno, com a separação de E dos demais grupos, sendo que: a separação entre C, D e F de G, H e I ocorreu por volta de 0,79 Ma (95% HPD = 0,54 – 1,04); entre I e G e H a 0,6 Ma (95% HPD = 0,32 – 0,91) e entre C e D ocorreu por volta de 0,59 Ma (95% HPD = 0,34 – 0,87) (Figura 19).

Figura 5. Árvore de máxima parcimônia obtida a partir do Cytb, com nove clados principais (A a I) nos ramos os valores de *bootstrap*, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies

Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir do Cytb, com nove clados principais (A a I) nos ramos os valores de *bootstrap*, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies

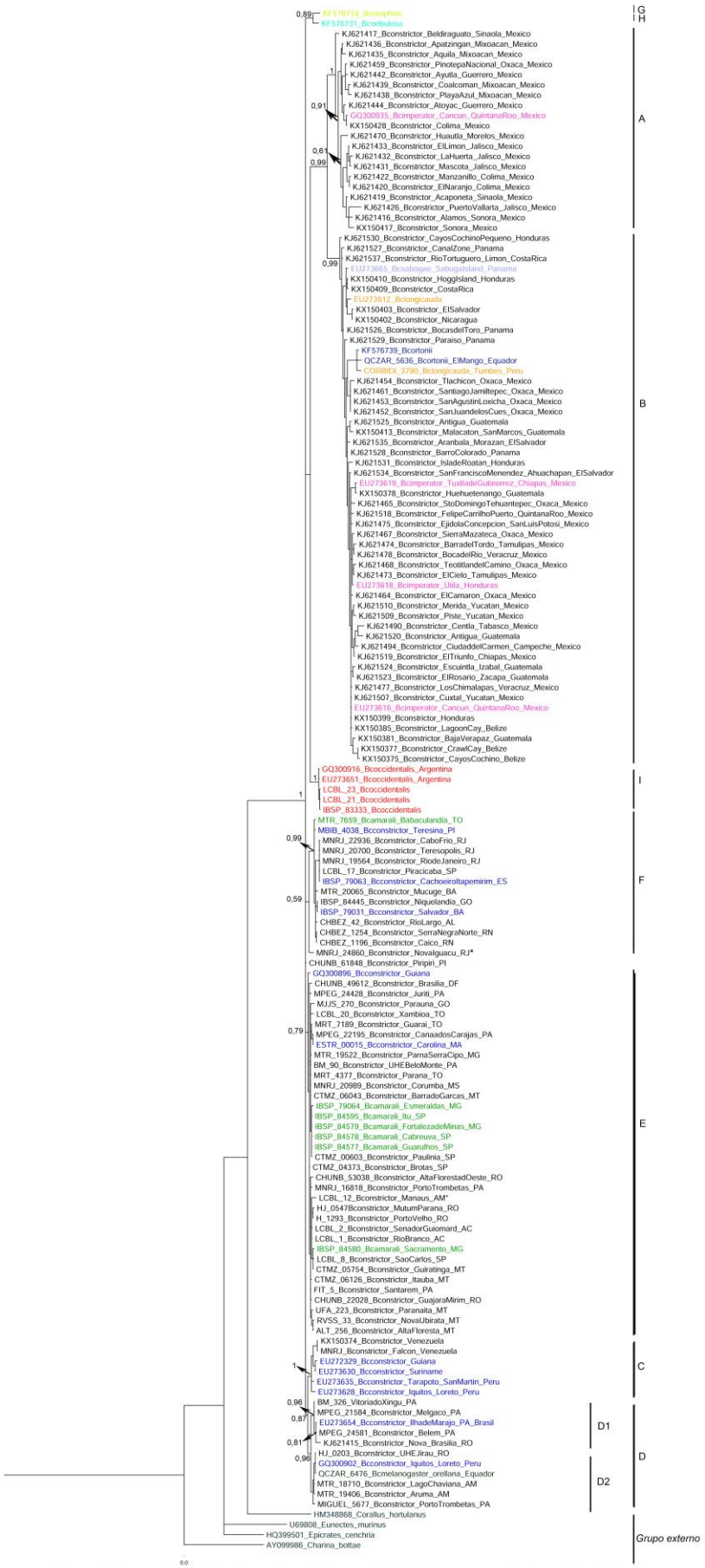


Figura 7. Árvore de inferência baeysiana obtida a partir do Cytb, com nove clados principais (A a I) nos ramos os valores de probabilidade posterior, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies

Figura 8. Árvore de máxima parcimônia obtida a partir do ND4, nos ramos os valores de *bootstrap* as cores correspondem aos morfótipos das subespécies

Figura 9. Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir do ND4, nos ramos os valores de *bootstrap*, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies.

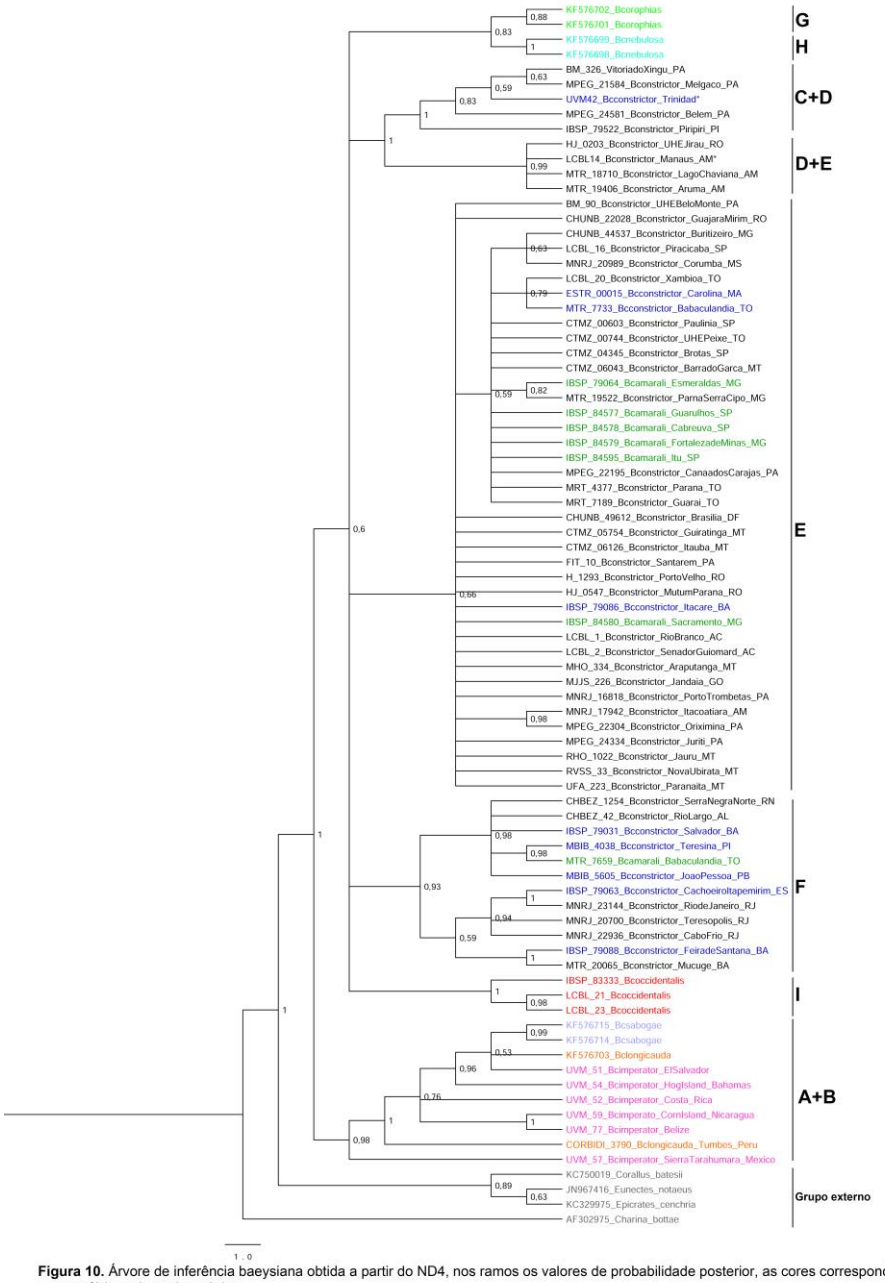


Figura 10. Árvore de inferência baeysiana obtida a partir do ND4, nos ramos os valores de probabilidade posterior, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies

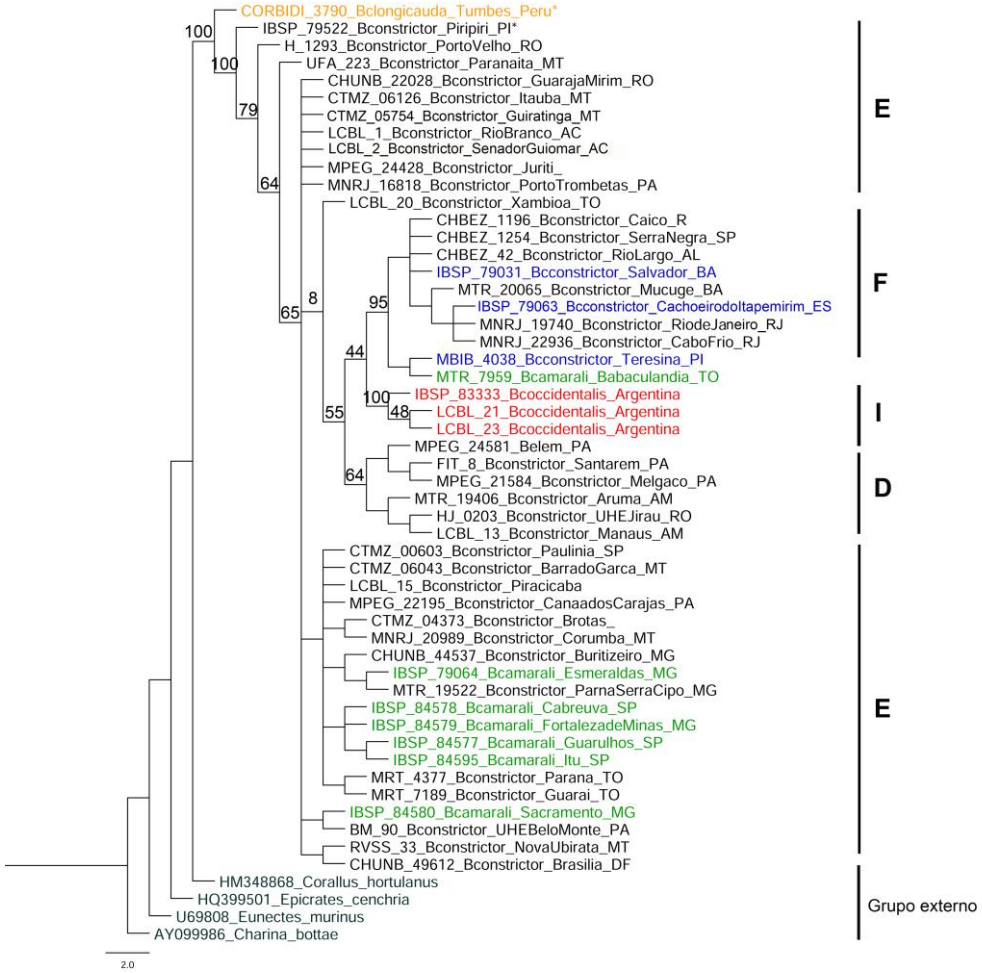


Figura 11. Árvore de máxima parcimônia obtida a partir de quatro genes concatenados (Cytb, ND4, ODC, NTF3), nos ramos os valores de *bootstrap*, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies.

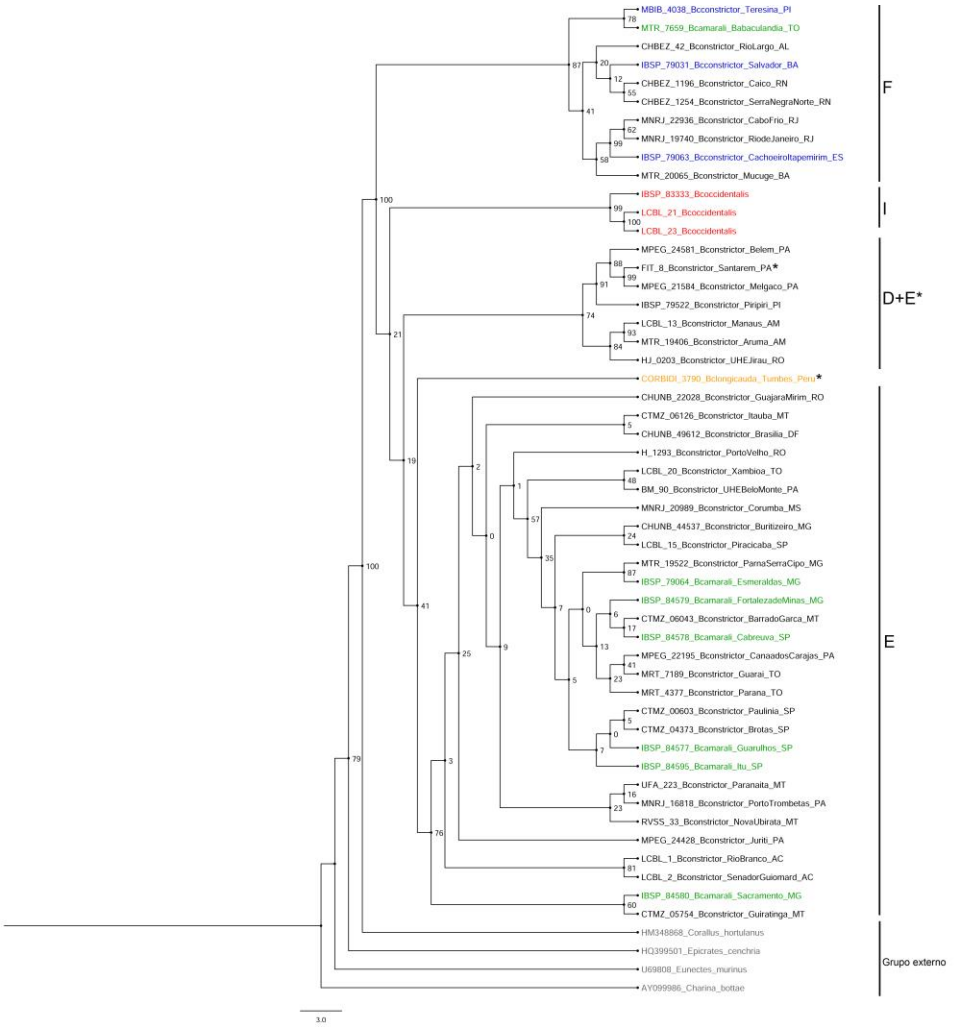


Figura 12. Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de quatro genes concatenados (Cytb, ND4, ODC, NTF3), nos ramos os valores de *bootstrap*, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies.

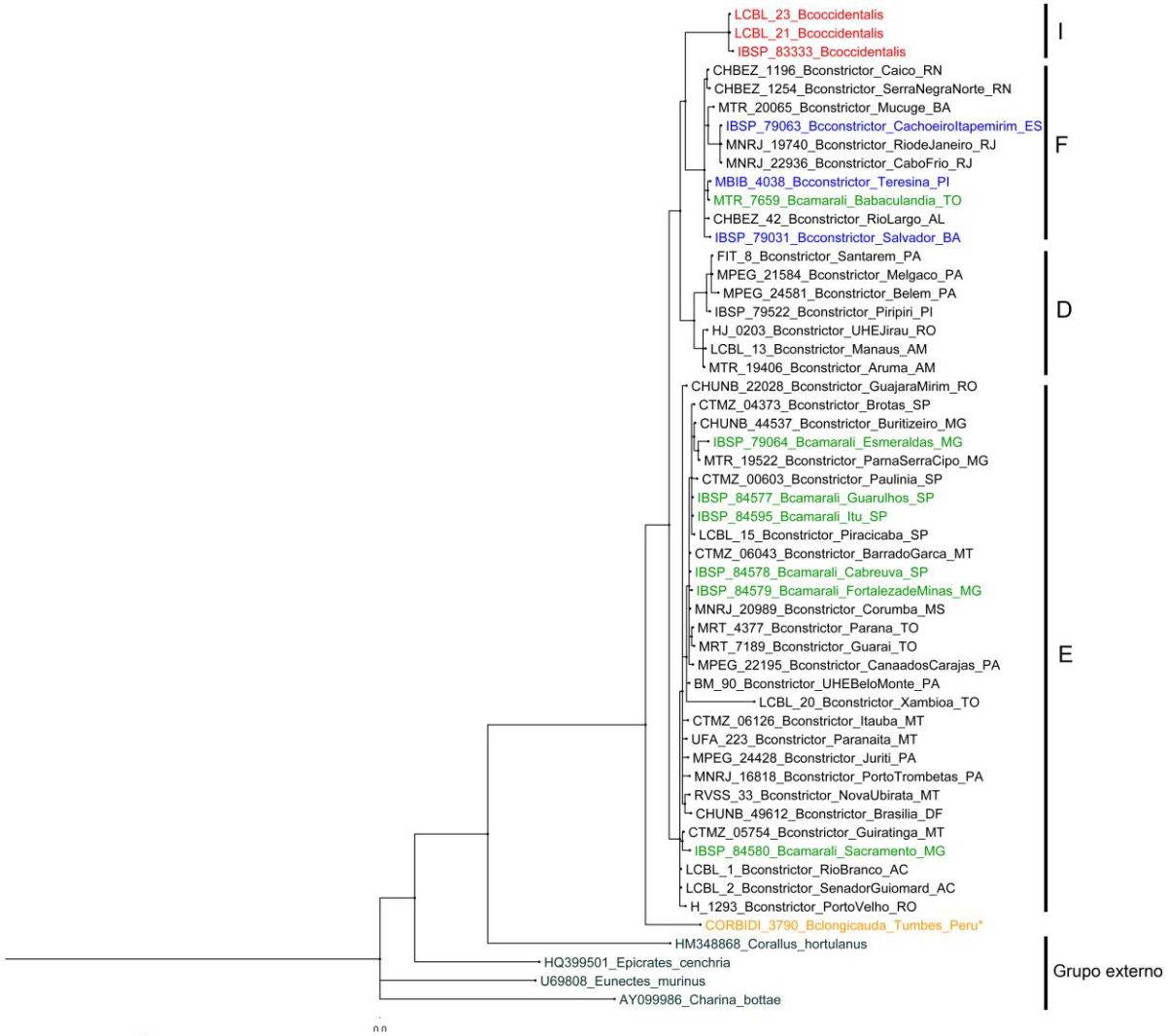
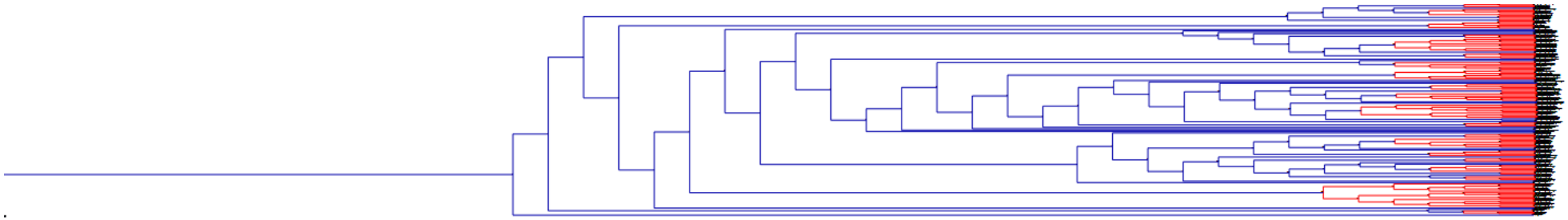
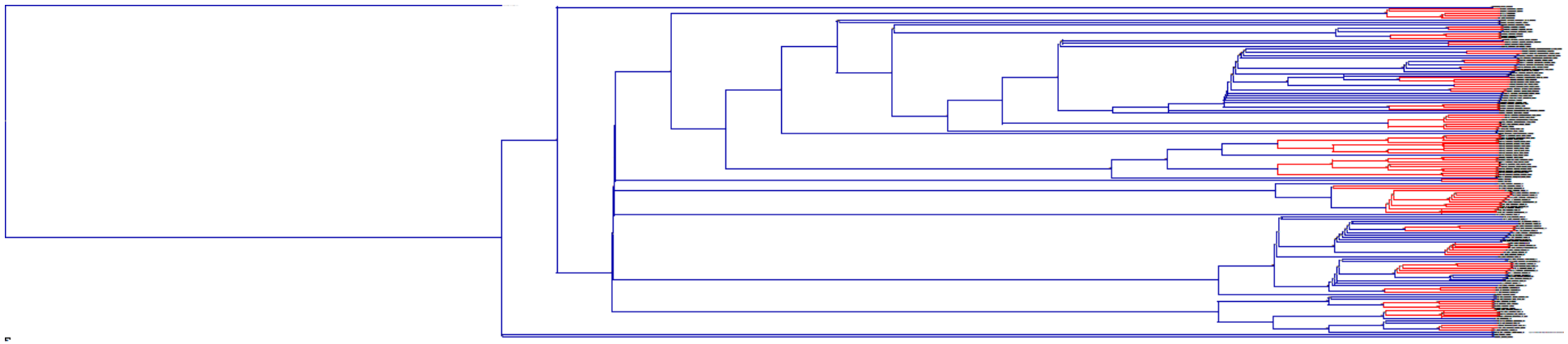
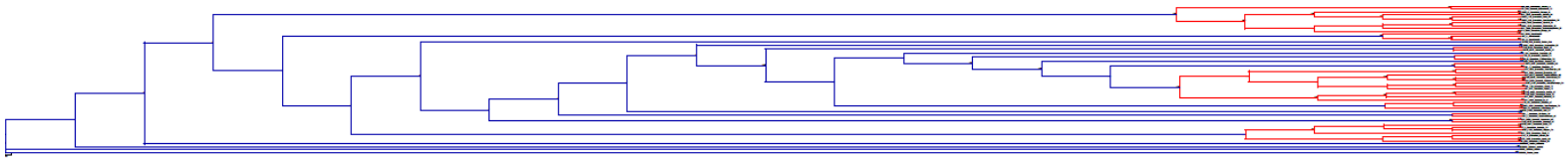
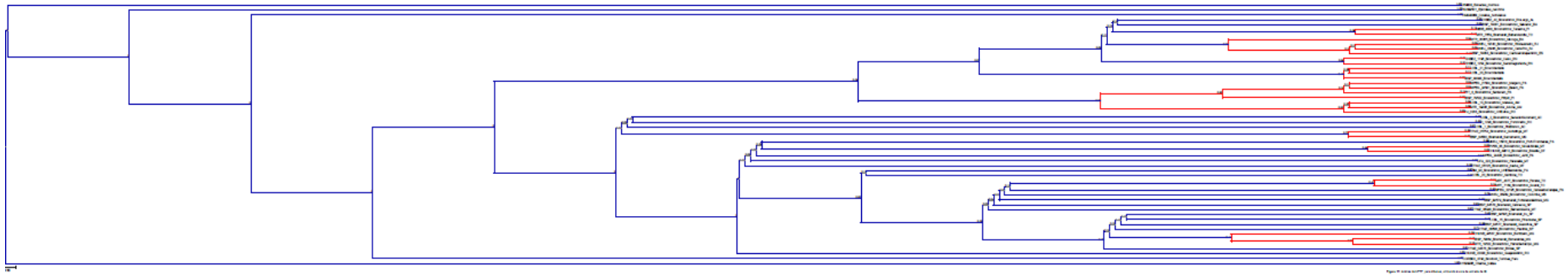


Figura 13. Árvore de inferência baeysiana obtida a partir de quatro genes concatenados (Cytb, ND4, ODC, NTF3), nos ramos os valores de probabilidade posterior, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies.









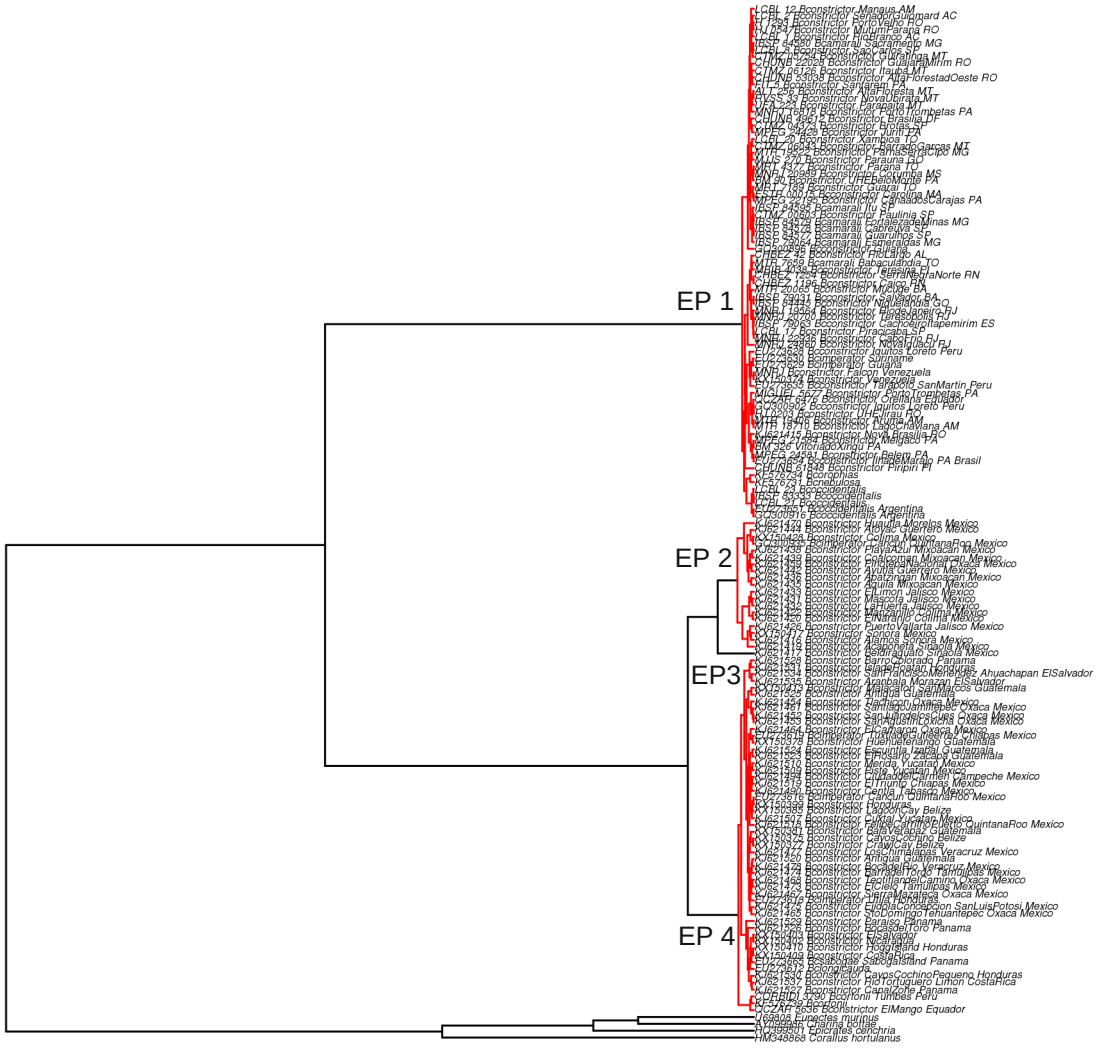


Figura 18: Árvore gerada por GMYC.

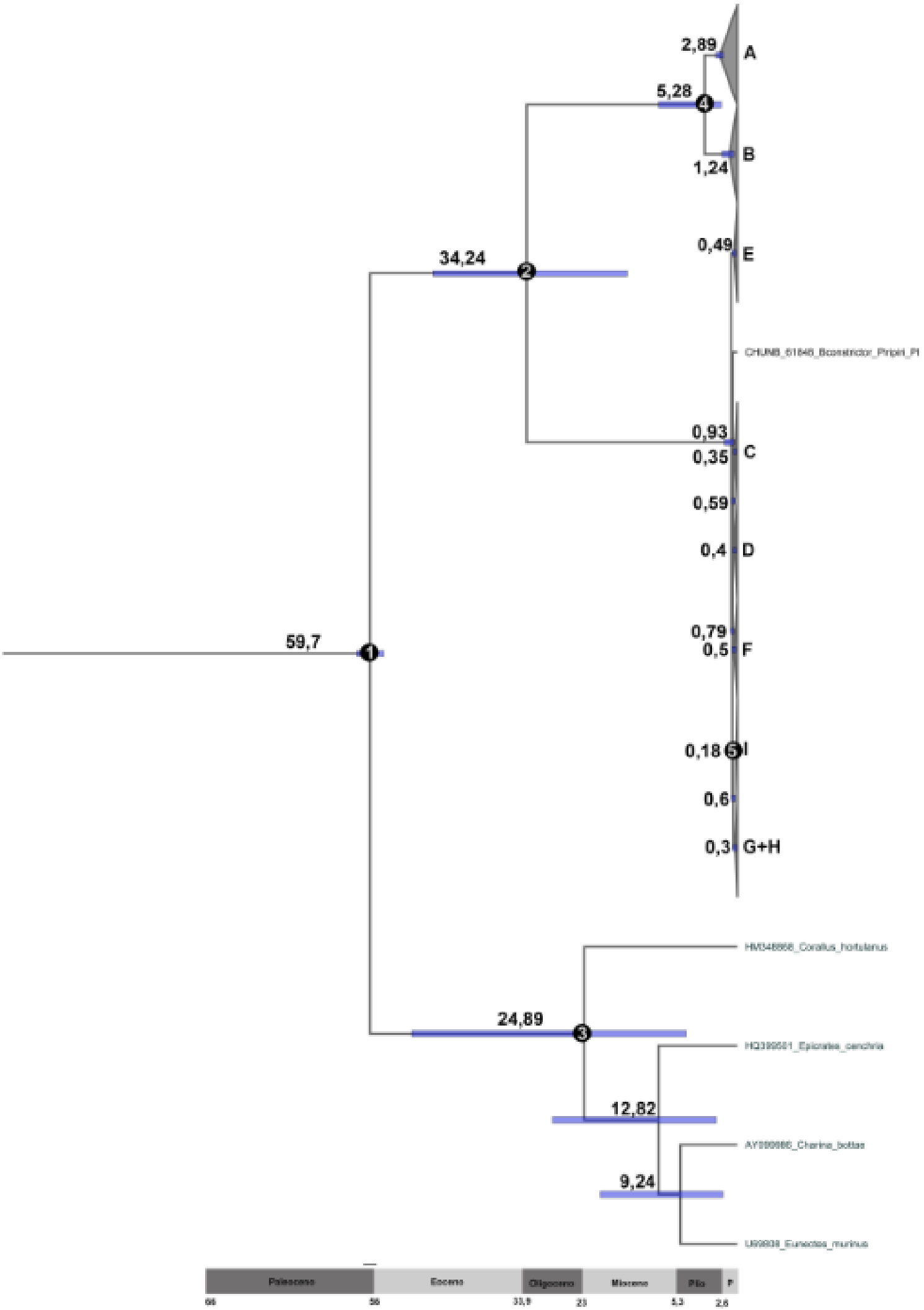


Figura 19. Datação molecular realizada com base no gene Cytb. Os números nos ramos representam a média da divergência em milhões de anos, e as barras indicam o intervalo de 95 % de confiança. Círculos pretos de 1 a 5 indicam os nós com calibração fóssil.

5 DISCUSSÃO

Este estudo apresenta a amostragem mais ampla até então realizada para *Boa constrictor*, tanto em termos de exemplares e número de subespécies, quanto em localidades para a América do Sul, contemplando 12 países da região neotropical, representando a maior abrangência em termos de domínios morfoclimáticos.

Neste trabalho, somando-se as sequências aqui obtidas àquelas disponíveis no *GenBank*, foi possível analisar 10 subespécies de *Boa constrictor: B. c. amarali, B. c. constrictor, B. c. imperator, B. c. longicauda, B. c. melanogaster, B. c. occidentalis, B. c. orophias, B. c. ortonii, B. c. nebulosa* e *B. c. sabogae.*

É importante ressaltar que, embora tenhamos realizado análises para todas as matrizes descritas no item material e métodos, iremos delinear a discussão em torno das análises feitas para Cytb e 4Genes; a primeira por se tratar da matriz com a maior amostragem, e a segunda por possuir o maior número de pares de bases.

5.1 Análises Filogenéticas

5.1.1 Grupos recuperados

O gênero *Boa* foi recuperado como um grupo monofilético, com valores de suporte elevados, em todas as análises de reconstrução filogenética (MP, MV e IB), corroborando resultados previamente publicados (Hynková *et al*., 2009; Reynolds *et al*., 2013; Suárez-Atilano *et al*., 2014; Card *et al*., 2016). Embora no presente estudo tenham sido utilizadas algumas sequências oriundas destes trabalhos, os clados, as relações entre eles e o grau de suporte estatístico divergem daqueles descritos por Hynková *et al.* (2009), Suárez-Atilano *et al.* (2014) e Card *et al.* (2016).

Em relação à dicotomia entre México/América Central e América do Sul, os resultados aqui apresentados corroboram aqueles reportados por Hynková *et al*. (2009), Suárez-Atilano *et al*. (2014) e Card *et al*. (2016); sendo que Hynková *et al*. (2009) e Suárez-Atilano *et al*. (2014) relataram a existência de duas linhagens distintas entre a porção norte (desde a costa pacífica,

porção Trans-Andina da América do Sul e estendendo-se até o México) e a porção sul do continente, enquanto Card *et al*. (2016) consideram três linhagens, sendo uma na América do Norte (costa pacífica do México), uma na América Central e outra na América do Sul. Nas análises aqui apresentadas, não houve recuperação de nenhum indivíduo pertencente à porção sul em clados na porção norte, nem recuperação de indivíduos da porção norte em clados da porção sul. Entretanto, a existência dos clados Norte e Sul, nitidamente apontada por aqueles autores não foi observada claramente em nosso estudo, uma vez que, em algumas topologias, I e E são recuperadas como grupo irmão de A+B, e G+H (das ilhas Dominica e Santa Lucia, América Central) são sempre recuperados juntamente com a porção sul.

Similarmente, os agrupamentos internos recuperados no presente trabalho não correspondem totalmente àqueles descritos por Hynková *et al*. (2009), Suárez-Atilano *et al*. (2014) e Card *et al*. (2016), uma vez que foram recuperados nove grupos (A a I), dois pertencentes a América do Norte/Central e sete para a América do Sul, que de maneira geral, exibiram composição congruente, entre os diferentes conjuntos de dados e entre as diferentes análises (apesar de não possuírem exatamente os mesmos indivíduos nas diferentes matrizes) (Figuras 5 a 13, Anexos 1 a 6), ao passo que os suportes e as relações entre os mesmos foram mais variáveis.

Para a porção Norte, foram recuperados dois clados, A e B, onde o A reúne indivíduos distribuídos ao longo da Zona de Transição Mexicana e Domínio Mesoamericano, e B engloba indivíduos distribuídos na Zona de Transição Mexicana, Domínio Mesoamericano e Domínio Pacífico (Figura 4). Os clados A e B sempre foram recuperados como irmãos (Figuras 5 a 7). Esta configuração de grupos associados às cadeias montanhosas no México, costa do Pacífico na América do Sul e América Central, também foi relatada por Hynková *et al*. (2009); Suárez-Atilano *et al*. (2014) e Card *et al*. (2016).

Uma vez que Hynková *et al*. (2009); Suárez-Atilano *et al*. (2014) e Card *et al*. (2016) empregaram um número muito maior de exemplares do México e América Central, além das sequências utilizadas possuírem comprimento maior (em pares de bases), também realizaram análises populacionais, proporcionando um reconhecimento mais acurado dos agrupamentos na porção norte; ao passo que nós utilizamos um número maior

de indivíduos da porção sul, permitindo uma distinção mais detalhada para esta parte do continente.

Para a porção sul do continente, foram recuperados sete clados: C, D, E, F, G, H e I; onde C, D, E e F são formados por indivíduos de diferentes domínios morfoclimáticos.

O clado C engloba indivíduos distribuídos no extremo norte amazônico, correspondendo ao Domínio Boreal Brasileiro e Domínio Sul Brasileiro. O clado D compreende dois subclados, D1 e D2, onde D1 agrupa indivíduos distribuídos nos Domínios Boreal Brasileiro, Sul Brasileiro e Sudoeste Amazônico; ao passo que D2 agrupa indivíduos Domínios Boreal e Sul Brasileiro. Estes dois clados foram recuperados como irmãos, na maioria das análises, e possuem uma intercessão em Iquitos (Peru) (Figura 4).

O clado E representa o maior agrupamento da porção sul, englobando exemplares distribuídos por todo o território brasileiro, em diferentes domínios: Domínios Boreal Brasileiro, Domínio Sul Brasileiro, Domínio Sudoeste Amazônico, Domínio Chaquenho (Província do Cerrado) e Domínio Paraná (Província da Floresta do Paraná). As relações do clado E com os outros grupos foi muito variável, cuja distribuição se sobrepõe a C e D (Figura 4).

O clado F é composto por indivíduos distribuídos pela Domínio Paraná (Província da Floresta do Paraná e Província Atlântica) e Domínio Chaquenho (Província do Cerrado e Província da Caatinga), sobrepondo-se a E (Figura 4).

Os únicos grupos que mantiveram sua composição constante, onde foram sempre recuperados os mesmos indivíduos e cujos indivíduos pertenciam a um único domínio morfoclimático foram G, H e I.

O clado I é formado exclusivamente por indivíduos de *B. c. occidentalis*, subespécie correlacionada ao Chaco úmido (Domínio Chaquenho, Província Chaco). Este clado não se sobrepõe a nenhum outro (Figura 4).

Foram recuperados também dois clados irmãos formados por *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias,* G e H, respectivamente, que são indivíduos de ilhas do Caribe (Santa Lúcia e Dominica), pertencentes à Subregião Antilhana (Província das Antilhas Menores). Apesar de pertencerem a América Central,

os clados G e H foram sempre recuperados associados aos clados da porção sul (Figura 4).

No presente trabalho, alguns indivíduos diferentes pertencentes a uma mesma localidade foram recuperados em clados distintos. Isto ocorreu para as amostras de Iquitos (Peru), Guiana, Babaçulândia (TO), Manaus (AM), Piracicaba (SP) e Santarém (PA). As sequências de Iquitos (Peru) e da Guiana, foram geradas por Hynková *et al*. (2009) e os autores ressaltam que o trabalho foi desenvolvido com base em animais de criadouro, muitos dos quais a origem é incerta. Babaçulândia (TO), Manaus (AM), Santarém (PA) e Iquitos (Peru) localizam-se em margens de rios, de modo que não seria difícil, para um organismo com potencial dispersivo, de se atingir locais diferentes daqueles de onde nasceu.

5.1.2 Relações entre as subespécies

A maioria das subespécies não foi recuperada como grupos monofiléticos, uma vez que uma mesma subespécie foi recuperada em clados distintos. Adicionalmente, mais de uma subespécie foi recuperada em um mesmo clado. Este padrão também foi relatado por Hynková *et al*. (2009). Suárez-Altilano *et al*. (2014) e Card *et al*. (2016) não especificaram os morfótipos dos animais dos quais obtiveram amostras.

No que se refere à *B. c. imperator*, os exemplares agrupam-se com as subespécies *B. c. sabogae*, *B. c. longicauda,* similar ao que foi descrito por Hynková *et al*. (2009). Embora Suárez-Altilano *et al*. (2014) não tenham identificado ao nível subespecífico suas amostras (todas estão depositadas no *GenBank* apenas como *B. constrictor*), os autores tratam as mesmas como pertencentes à subespécie *B. c. imperator*, assumindo que todas as populações do México e América Central pertencem a esta subespécie. Se isto for levado em consideração, o clado A recuperado em nossas análises é formado apenas por *B. c. imperator*; entretanto, ainda assim esta subespécie não seria monofilética, dado que outros indivíduos de *B. c. imperator* foram recuperados juntamente com *B. c. sabogae*, *B. c. longicauda* e *B. c. ortonii,* no clado B. do presente trabalho.

Quanto às relações descritas para *B. c. sabogae,* os resultados corroboram os de Hynková *et al.* (2009), uma vez que esta subespécie foi recuperada com amostras da América Central, juntamente com *B. c. imperator* e *B. c. longicauda*.

Para *B. c. longicauda,* a sequência do *GenBank* EU273612 de Hynková *et al*. (2009), cuja localidade de procedência não é conhecida, foi recuperada juntamente com indivíduos da América Central, corroborando os resultados descritos por Hynková *et al*. (2009); enquanto que a sequência de *B. c. longicauda* do presente trabalho (CORBIDI3790, Tumbes, Peru) foi recuperada com as amostras de *B. c. ortonii* (QCZAR5636, El Mango, Equador, e KF576739 sem localidade), e na ausência destas, foi recuperada em diferentes clados.

As subespécies *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias* foram descritas inicialmente como táxons endêmicos das ilhas Dominica e Santa Lúcia, respectivamente. As sequências identificadas como pertencentes a estas subespécies foram recuperadas em dois clados G e H (em ND4, matriz que incluiu dois indivíduos de cada subespécie, elas são recuperadas cada uma formando clados distintos com elevados valores de suporte, Figuras 8 a 10). Entretanto, a relação do clado G+H com o restante das amostras foi variável, ora recuperado como irmão de todos os outros agrupamentos (A, B, C, D, E, F e I; Figuras 6 e 7), ora recuperado como irmão das amostras da América do Sul (Figura 5). Nos trabalhos desenvolvidos com *B. constrictor* que empregam indivíduos de ilhas (Hynková *et al*., 2009; Green, 2011; Suárez-Altilano *et al*., 2014), não foram empregadas as subespécies *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias*.

A localidade tipo de *B. c. constrictor* é Paramaribo (Suriname), cujo morfótipo está associado às populações amazônicas, enquanto a localidade tipo de *B. c. amarali* é São Paulo (SP), estando esta subespécie relacionada às populações de Mata Atlântica, em sua descrição. *B. c. amarali* e *B. c. constrictor* foram recuperadas juntas, associadas às amostras da Província Atlântica e Província da Caatinga (no clado F); *B. c. amarali* também foi recuperada com amostras clado E. A associação destas duas subespécies em um mesmo clado também foi descrita Hynková *et al*. (2009), que relatou não haver evidências genéticas de distinção entre as duas subespécies.

Hynková *et al.* (2009) não conseguiram distinguir molecularmente as subespécies *B. c. constrictor* de *B. c. amarali*, e, apesar de ter recuperado *B. c. occidentalis* como um clado mais diferenciado, sugeriram que as populações da América do Sul fossem tratadas como *Boa constrictor constrictor*; enquanto Card *et al*.(2016) sugerem que as populações da América do Sul sejam chamadas de *Boa constrictor.*

A única amostra empregada neste estudo de *B. c. melanogaster* foi recuperada juntamente com outros indivíduos sem identificação subespecífica (do PA, RO, AM) e *B. c. constrictor* (EU273654 Iquitos, Peru). Uma vez que a localidade tipo de *B. c. melanogaster* é Morona-Santiago, no Equador, esta subespécie está relacionada às populações de floresta tropical úmida, mas da porção cis-Andina da América do Sul.

As três subespécies recuperadas como monofiléticas são: *B. c.nebulosa, B. c. orophias* e *B. c. occidentalis*.

B. c. occidentalis foi recuperada sempre com elevados valores de suporte. Esta subespécie é também recuperada como um agrupamento monofilético por Hynková *et al*. (2009); Reynolds *et al*. (2013); Suárez-Atilano *et al*. (2014). Excepcionalmente, no presente trabalho foi obtida a recuperação de *B. c. occidentalis* juntamente com amostras da porção norte (agrupamentos A e B, Cytb/IB, Figura 7), e também com as subespécies de ilha (grupo G+H, análise de tempo de divergência, Figura 11), embora os suportes sejam baixos.

A reunião das subespécies da costa do Pacífico na América do Sul, *B. c. longicauda* e *B. c. ortonii*, com a subespécie da América Central/México, *B. c. imperator*, e a subespécie de ilha, *B. c. sabogae* em um único clado, fez com que Hynková *et al*. (2009) sugerissem que as populações da costa pacífica da América do Sul até o México fossem chamadas por *B. c. imperator sensu lato*; enquanto Reynolds *et al*. (2013) e Suárez-Atilano *et al*. (2014) tratam as populações da América Central e México como *Boa imperator*. Card *et al*. (2016) reconheceram como *Boa imperator* as populações da América Central, América do Sul (Colômbia e Equador) e América do Norte (oeste do istmo de Tehuantepec); adicionalmente, estes autores reconhecem uma linhagem na América do Norte, associada às populações distribuídas ao longo da costa pacífica ocidental do Istmo Tehuantepec, e recomendam o nome *Boa sigma*.

5.1.3 Fatores responsáveis por gerar incongruências nas análises filogenéticas

Apesar do imenso progresso nos últimos anos, a reconstrução filogenética ainda envolve muitos vieses que criam incerteza em relação ao verdadeiro relacionamento dos organismos ou genes analisados (Som, 2014). A incongruência filogenética pode ser gerada por dois fatores principais: metodológicos e biológicos. Na primeira categoria, encontram-se as escolhas analíticas, como o número de amostras taxonômicas, o número de caracteres avaliados e o critério de otimização aplicado. Na segunda categoria, encontram-se os processos biológicos que podem resultar em conflitos filogenéticos, como a origem dos dados (se genômico ou morfológico) ou pressão seletiva em certos caracteres (Philippe *et al*., 2011; Dávalos *et al*., 2012).

No presente trabalho, uma característica marcante observada em nossas matrizes foi a homogeneidade das sequências. Uma matriz muito homogênea poderia estar ligada a dois fatores: ou não ocorrem mudanças na estrutura genômica e/ou o grupo passou por mudanças recentes que ainda não se fixaram na população. Uma vez que genes e genomas são estruturas dinâmicas, a segunda premissa mostra-se mais plausível. De acordo com a análise de datação (que será discutida adiante), a maioria dos grupos recuperados na filogenia iniciaram sua diversificação no Pleistoceno, um período recente se comparado à idade estimada do grupo, a cerca de 40 milhões de anos (Albino, 1993). Outro fato que pode corroborar esta explicação são os comprimentos de ramos curtos encontrados nas árvores filogenéticas. Ramos internos curtos podem indicar que o tempo transcorrido durante os eventos de diferenciação/especiação nas linhagens é muito pequeno para permitir o acúmulo de substituições nucleotídicas, uma característica geralmente associada a linhagens com divergência recente (Soltis e Soltis, 2003).

A composição das matrizes também produziu reflexos na metodologia escolhida para construir as filogenias. As topologias geradas por Máxima Parcimônia apresentaram mais politomias do que aquelas geradas por Máxima Verossimilhança ou Inferência Bayesiana. Isto pode ter ocorrido devido ao número de sítios informativos presentes nas matrizes não ser suficiente

para uma resolução mais acurada, uma vez que a parcimônia, diferentemente métodos estatísticos, emprega apenas os sítios informativos. Outra explicação é que a parcimônia tem um poder explanatório maior, ou seja, ela considera mais hipóteses, enquanto os métodos probabilísticos só recuperam uma árvore ótima (Felsestein, 2004). Entretanto, como notado por Padial *et al*. (2014), o número de sítios informativos também pode influenciar nos métodos probabilísticos.

Uma vez que as matrizes são muito homogêneas, um único caráter diferente tem muita influência. Por exemplo, na matriz de Cytb, dois indivíduos de *B. c. occidentalis* possuem, na posição 109 da matriz, a mesma base (T) que os indivíduos de *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias*, tornado essas sequências quase idênticas (ver tabela X nos anexos). Isto pode ser explicado por erros de leitura, mutação pontual ou, ainda, por paralelismo.

A amostragem pode influenciar significativamente os resultados na filogenia e muitos trabalhos investigaram qual a melhor estratégia para atingir-se uma amostragem ótima (aumentar o número de táxons ou de sequências) e se obter uma filogenia robusta (Rokas e Carroll, 2005; Gatesy *et al*., 2007; Philippe *et al*., 2011). Em um estudo clássico, Rokas *et al*. (2003) investigaram as relações filogenéticas em sete espécies de *Saccharomyces*, compilando uma matriz com 106 genes e 127.026 pares de bases, onde obtiveram resultados de *bootstrap* de 100% para todos os clados recuperados, tanto nas análises de Parcimônia quanto em Verossimilhança, mas, ainda assim, encontraram conflitos topológicos entre árvores gênicas. Outros trabalhos apontam que o número de caracteres analizados teve maior influência na resolução filogenética que o número de táxons amostrados (Bremer *et al*., 1999; Rokas e Carroll, 2005). Entretanto, a estratégia de amostragem (se táxons a mais ou sequências a mais), parece depender do grupo analisado, e, ainda, do nível de relações investigadas, se entre táxons mais inclusivos (ordens, famílias) ou menos inclusivos (espécies, subespécies) (Pick *et al*., 2010).

Em nosso estudo, pode-se notar que o número de indivíduos presente na matriz demonstrou ser mais resolutivo do que o número de pares de bases, uma vez que as análises feitas para um único gene recuperaram os agrupamentos filogenéticos de forma mais robusta que as análises feitas com

quatro genes concatenados. No entanto, uma análise com mais indivíduos para os quatro genes, poderá demonstrar resultados ainda mais robustos.

O conflito filogenético entre diferentes topologias também pode surgir devido a utilização de marcadores de diferentes fontes: se o marcador tem origem mitocondrial ou nuclear (Degnan e Rosenberg, 2006). Marcadores mitocondriais e nucleares possuem taxas de evolução distintas. Devido às suas características funcionais (como ausência de recombinação, reparo ineficiente e altas taxas de substituição) o genoma mitocondrial possui evolução mais rápida do DNA, em uma proporção 10 vezes maior do que o nuclear, e isso reflete-se na presença (na maioria das espécies animais analisadas) de alta variação da sequência de nucleotídeos em determinadas regiões (Brown *et al*., 1979; Birky, 2001; Ballard e Whitlock, 2004; Ballard e Rand, 2005). Nossos dados são coerentes com estas premissas, pois as matrizes para as quais possuíamos a maior quantidade de sítios informativos foram aquelas geradas pelos marcadores mitocondriais, ao passo que as nucleares se mostraram mais conservadas. Isto teve um forte impacto nas reconstruções filogenéticas, pois as topologias geradas pelos marcadores nucleares demonstraram pouca ou nenhuma resolução (Anexos 1 a 6).

Além disso, ao se tratar de genomas mitocondriais, também deve-se considerar erros estocásticos, como sorteio incompleto de linhagens, retenção de polimorfismos ancestrais, paralogia, substituições saturadas e evolução não-neutra (Wendel e Doyle, 1998; Slowinski e Page, 1999, Degnan e Rosenberg, 2006).

5.2 Análise de Delimitação de Espécie (ADE)

Em nenhuma das ADEs (bPTP e GMYC) *Boa constrictor* foi recuperada como uma única Espécie Putativa, ou seja, a hipótese nula de que todas as sequências pertencem a uma mesma espécie foi rejeitada por estes métodos. Similarmente, as subespécies não foram recuperadas, na maioria dos casos, como espécies putativas únicas.

As amostras identificadas como pertencentes a *B. c. occidentalis* foram as únicas que foram agrupadas dentro de uma mesma EP. No caso de *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias*, embora tenham sido agrupadas como uma

única EP em Cytb/IB, foram recuperdadas como duas EPs distintas em Cytb/MV, indicando diferenciação desses táxons, reiterado pelas análises filogenéticas (Figuras 10 a 13).

No único trabalho realizado até o momento que aborda a metodologia de delimitação de espécie em *B. constrictor*, Card *et al*. (2016) apontam a estruturação de clados Norte, Centro e Sul dentro do continente americano, defendendo a hipótese de múltiplas espécies em *B. constrictor.*

Nas nossas análises de ADE, o número de EPs variou de 15 a 70 espécies putativas (Tabela 8). Este número provavelmente está superestimado, pois em todas as topologias das árvores geradas por bPTP e GMYC temos a reunião de diferentes subespécies (inclusive em GMYC daquelas recuperadas monofiléticas na filogenia, e.g *B. c. occidentalis*), além da reunião de amostras do norte e do sul trans-Andinas, e no sul de leste a oeste. Isto gera um panorama que permite contato/fluxo gênico entre as diferentes populações, o que não condiz com um cenário de isolamento requerido para o surgimento de um número tão elevado de táxons. Entretanto, se tomarmos como exemplo *B. c. occidentalis*, que do ponto de vista morfológico e molecular é distinguível das demais, esta variabilidade estaria sendo subestimada.

Possivelmente a aproximação mais realista é aquela fornecida pelo modelo de GMYC que estimou 4 EPs. Na medida em que uma destas EPs era apenas um indivíduo do México, as EPs apontadas em GMYC correspondem, de maneira geral, aos três principais clados filogenéticos reportados por Card *et al*. (2016), que estão amplamente distribuídos e equivalem as três porções primárias do Continente Americano.

5.3 Relação entre Filogenia, Análise de Delimitação de Espécies (ADE) e Implicações taxonômicas

Todos os trabalhos desenvolvidos para *B. constrictor*, sejam análises filogenéticas, filogegráficas ou de ADE; apontam para uma diversidade críptica, com estruturação de diferentes grupos ao longo da distribuição de *B. constrictor*, o que fez com que alguns autores recomendassem a subdivisão do gênero.

Hynková *et al*. (2009) agrupa todas as subespécies que ocorrem na América Central e México sob a designação de *B. c. imperator sensu lato* e sugere que *B. c. imperator* seja elevada à categoria de espécie plena. Reynolds *et al*. (2014) e Suárez-Altilano *et al*. (2014), trabalhando com populações de *B. c. imperator* da América Central e México, sugere que esta seja reconhecida como espécie e Card *et al*.(2016) corroboram estes dois resultados e sugerem, ainda, o reconhecimento de *Boa sigma*. Similarmente, em nosso estudo também encontramos esta estruturação entre Norte e Sul. Assim, dentro daquilo que cada trabalho considerou como espécie, diferentes subespécies são reunidas, indicando que as subespécies reconhecidas com base em caracteres de morfologia externa (padrões de coloração e dados merísticos) podem não corresponder a real variabilidade da espécie.

Com relação as análises de ADE, nossos dados estão de acordo com os reportados por Card *et al*. (2016), e sugerem a existência de mais de um táxon em *Boa constrictor,* da mesma forma que as análises filogenéticas.

Assim, se somarmos isso aos nossos dados filogenéticos e àqueles reportados pela literatura, consideraremos a existência de ao menos três linhagens dentro de *Boa* (sob o conceito de espécie aqui adotado): na primeira, poderíamos associar o nome *B. constrictor (sensu stricto*), apresentando distribuição por toda porção cis-Andina da América do Sul, implicando na provável sinonimização de *B. c. eques*, *B. c. melanogaster* e *B. c. amarali* a primeira; a segunda estaria representada por *Boa occidentalis*, que ocuparia a porção mais austral do continente, distribuída nos ambientes chaquenhos; e a terceira seria *Boa imperator,* ocorrendo em florestas úmidas continentais e insulares da América Central até a vertente Pacífica da América do Sul, implicando na provável sinonimização de *B. sabogae*, *B. longicauda*, *B. ortonii*. Contudo, ao menos dois táxons endêmicos de ilhas (*B. c. orophias* e *B. c. nebulosa*), para as quais avaliamos apenas as sequências disponíveis, devem ser re-avaliadas em abordagens futuras, dada a recuperação das mesmas em clados distintos.

5.4 Tempos de Divergência

A origem de *Boa* é considerada como tendo ocorrido na porção sul da América do Sul (Noonan e Chippindale, 2006 a, b), entre 39 e 41.6 Ma, de acordo com registro fóssil (Eoceno tardio, Barrancan, Argentina) (Albino *et al*., 2008). Entretanto, no presente trabalho, a origem de *Boa* foi estimada por volta de 59.7 Ma, no Paleoceno. A separação entre as linhagens Norte e Sul ocorreu por volta de 34.24 Ma, e a diversificação da primeira ocorreu no Plioceno, antes da linhagem Sul, cuja diversificação ocorreu no Pleistoceno.

Os trabalhos disponíveis, nos quais foi realizada uma datação para *Boa,* descreveram tempos de divergência díspares para a separação Norte e Sul.

Green (2011) estimou que o tempo de separação entre as linhagens da porção norte do continente da porção sul teria ocorrido há 3.87 Ma; ao passo que Suárez-Atilano *et al*. (2014) estimaram que este evento teria ocorrido em 7.41 Ma; enquanto Card *et al*. (2016) estimaram que a divergência deu-se por volta de 20 Ma. Existem estudos demonstrando que idades mais antigas são recuperadas quando as análises de tempo de divergência são feitas utilizando-se conjuntos de dados com mais terminais do que quando são usados menos terminais (Yoder & Yang 2004, Linder *et al*. 2005). O conjunto de dados utilizado por Card *et al*. (2016) é o maior dentre todos (296 sequências); contra 48 empregadas por Green (2011), 122 utilizadas por Suárez-Atilano *et al*. (2014) e 151 do presente estudo, e no entanto, as idades que reportamos são mais antigas.

A utilização de diferentes premissas para a datação também pode ocasionar este tipo de situação. Green (2011) utilizou para sua inferência apenas taxas de substituição, Suárez-Atilano *et al*. (2014) empregaram fósseis e taxas de substituição de nucleotídeos, enquanto Card *et al*. (2016) adotaram como premissa apenas os fósseis descritos para o grupo. Em nossas análises, empregamos tanto fósseis, quanto a taxa de mutação conhecida para o marcador Cytb (a mesma descrita por Suárez-Atilano *et al*., 2014). A quantidade de pontos de calibração adotados no presente trabalho e nos demais foram diferentes. Suárez-Atilano *et al*. (2014) empregaram três pontos, cada um correspondendo aos principais clados obtidos em sua filogenia; Card

et al. (2016) empregaram 13 pontos, um para cada linhagem obtida, ao passo que nosso estudo adotou cinco pontos (já descritos na sessão de metodologia).

O marcador utilizado também diferiu, pois Green (2011) utilizou ND4, enquanto Suárez-Atilano *et al*. (2014), Card *et al*. (2016) e nosso estudo, empregaram Cytb, sendo que nossas sequências eram menores em comprimento que as de Suárez-Atilano *et al*. (2014) e Card *et al*. (2016).

5.5 Hipóteses Biogeográficas

As hipóteses biogeográficas serão discutidas aqui com base nos agrupamentos recuperados nas análises filogenéticas e na datação realizada.

A dispersão da biota Neotropical do Sul para a América do Norte tem sido apoiada por vários trabalhos, que apontoam dois conjuntos de táxons que dividem a mesma história biogeográfica (denominados cenocrons): Neotropical Antigo, formado por táxons que dispersaram entre o Cretáceo e o Palaeoceno; e um mais recente, que dispersou entre o Plioceno e o Pleistoceno, após o estabelecimento do istmo do Panamá (Morrone, 2014 b).

A hipótese de divergência obtida no presente trabalho para a separação entre as linhagens Norte e Sul do continente americano (34,24 Ma) é muito anterior à consolidação do Istmo do Panamá *sensu strictu*, datado entre 5 Ma (Haug e Tiedemann, 1998) e 2.8 Ma (O'Dea *et al*., 2016). Esses resultados, somados aos dados da literatura, sugerem que a dispersão de *Boa* pelo continente tenha ocorrido se antes da formação do Istmo do Panamá (Burbrink, 2005; Noonan e Chippindale, 2006), fazendo parte do cenocron Neotropical Antigo. De fato, Head *et al*. (2012) descrevem um fóssil de *Boa* do Mioceno datado de 19.3 Ma, e com base nessa descrição, sugerem que o gênero colonizou a porção central do continente americano bem antes da consolidação do Istmo do Panamá, dispersando-se pelas proto-antilhas.

A hipótese de colonização da região central do continente e caribenha por meio de incursões pelas ilhas ainda em formação é uma das mais aceitas para explicar a biota destas regiões (Hedges *et al*., 1992; Hedges, 1996; Hedges 2006). Esta hipótese também pode ser utilizada para explicar os agrupamentos G e H, correspondente aos indivíduos das ilhas Santa Lucia e Dominica, *B. c. nebulosa* e *B. c. orophias*. De acordo com nossas análises, a

hipótese para o início de diversificação deste clado (G+H), é de cerca de 0.39 Ma, no Pleistoceno, coincidindo com o cenocron mais recente.

O soerguimento dos Andes é frequentemente associado à diversificação de vários grupos biológicos, incluindo serpentes (Savage, 2002; Farris *et al*., 2011). Este evento começou no Neógeno (23–2.5 Ma), consolidando-se a aproximadamente 10–6 Ma (Garzione *et al*., 2008). Entretanto, este não foi um evento único (tendo ocorrido em pulsos), e as informações relativas ao processo de orogenia desta cadeia de montanhas variam de acordo com o segmento da cordilheira e o período geológico considerado (Antonelli *et al*., 2008). Ao norte da cordilheira andina, existem as cordilheiras de Mérida, Oriental e Central da Colômbia, cuja elevação final é estimada em 10–8 Ma, delimitando a parte central do continente da porção sul (Cediel *et al*., 2003). Este sistema tem sido associado à diversificação de grupos do Sul e Norte do continente ameriano, como peixes (Lundberg *et al*., 1998) e mamíferos (Perea, 2009). De acordo com a datação realizada neste estudo, a divergência da porção Norte e da porção Sul ocorreu por volta de 34,24 Ma, antes da formação desta parte da cadeia ter sido completada, não representando uma barreira geográfica.

Dessa forma, os dois principais eventos associados à diversificação Norte/Sul de organismos no continente americano parecem não estar associados à diferenciação dos agrupamentos do Norte e do Sul em *Boa constrictor*.

No Clado Norte, a linhagem A reúne indivíduos da Zona de Transição Mexicana, formada por um conjunto de cordilheiras pertencentes a um sistema de montanhas limitadas pelo Cinturão Vulcânico Trans-Mexicano. O cinturão Trans-Mexicano é o maior arco vulcânico da América do Norte, com uma extensão aproximada de 160.000 km^2 de área e cerca de 1000 km de comprimento (18°30′ e 21°30′N), cuja formação final data do Plioceno tardio ao Pleistoceno (Ferrari *et al*., 2012). Esta formação atua como uma barreira à dispersão (Bryson *et al*., 2010; Bryson *et al*., 2011), fato que poderia atuar na diferenciação do grupo A. Outros grupos, cuja diferenciação genética está associada a esta região, são relatados, por exemplo, para as serpentes *Hypsiglena torquata* (Mulcahy, 2008) e *Trimorphodon biscutatus* (Devitt, 2006).

Suaréz-Altilano *et al*. (2014) e Card *et al.* (2016) também descrevem uma linhagem marcadamente distinta nesta região para *B. c. imperator*.

A linhagem B compreende indivíduos do México, América Central e porção trans-Andina da América do Sul. Esta região é formada por sistemas de montanhas (Istmos de Tehuantepec, Cordilheira de Talamanca, Sierra Madre de Chiapas, Sistema da Falha Motagua-Polochic-Jocotán) (Morrone, 2010), associadas com a estruturação de populações costeiras e de planícies ao longo das costas do Atlântico e Pacífico (na América Central) e somente Pacífico (na América do Sul) para outros grupos de serpentes, como *Atropoides occidus*, *Atropoides mexicanus, Bothriechis, Crotalus durissus, Trimorphodon biscutatus* (Wüster *et al*., 2005; Devitt, 2006; Castoe *et al*., 2009; Daza *et al*., 2010). Os Andes Centrais formaram-se através da colisão de um arco vulcânico com a margem sul-americana, do norte do Peru até a Colômbia, e acredita-se que o levantamento da cordilheira Central e Ocidental ocorreu principalmente durante o Cretáceo até o Paleoceno tardio, e que a elevação da Cordilheira Oriental ocorreu principalmente durante o Plioceno até o Holoceno (Gregory-Wodzicki, 2000). Neste caso, os Andes representaram uma barreira efetiva entre as populações no sentido leste/oeste da América do Sul, uma vez que estes eventos são bem anteriores ao período diferenciação do clado B, datado em torno de 1.24 Ma (Pleistoceno).

A diversificação dos clados da porção sul que possuem indivíduos provenientes das linhagens E e F iniciou-se por volta de 0.9 Ma (Calabriense, Pleistoceno), podemos associar esta diversificação às mudanças climáticas ocorridas no Pleistoceno.

Muitos modelos já foram propostos para tentar explicar a especiação na região amazônica e as principais hipóteses compreendem os refúgios pleistocênicos, gradientes ecológicos, incursões marinhas e os rios como barreiras (Wallace, 1854; Vanzolini e Williams, 1970; Patton *et al*., 2000; Haffer, 2008; Antonelli *et al*., 2010).

A teoria dos refúgios postula que a floresta amazônica tenha sofrido uma fragmentação, como resultado dos ciclos de expansão e retração vegetacional que ocorreram durante todo o curso do Quaternário (2.5 Ma): nos períodos secos e frios as savanas (Cerrado) expandiam e adentravam nas áreas de floresta, enquanto estas retraíam para refúgios periféricos; e durante

os períodos quentes e úmidos, a floresta úmida se expandia e a vegetação de savana retraía-se, assim, a especiação ocorreria através do isolamento das populações em refúgios de floresta; por outro lado, teriam possibilitado a interligação entre Amazônia e Cerrado (Haffer, 1997; Haffer e Prance, 2001; Haffer, 2008). Esta conexão é plausível para explicar o padrão encontrado na linhagem E.

De acordo com o modelo do gradiente ecológico, uma população, distribuída ao longo de um gradiente ambiental, pode se diferenciar em grupos distintos (porém ainda contíguos) de subpopulações sem o completo isolamento geográfico (Hendler, 1982). A hipótese dos rios como barreiras, inicialmente proposta por Wallace (1854), postula que os rios seriam barreiras eficientes no isolamento das populações na Amazônia. Estes dois mecanismos, gradiente ecológico e rios como barreiras, não parecem ter influenciado significativamente na diferenciação de *Boa constrictor* e nos padrões aqui recuperados, uma vez que as linhagens D e E reúnem indivíduos de ambas as margens do Rio Amazonas.

Interligações entre populações de distribuição trans-Amazônica são relatadas, para diferentes grupos de ornagismos, como anfíbios (Fouquet *et al*., 2015), aves (Miller *et al*., 2008) e borboletas (Penz *et al*., 2015). Da mesma forma, conexões entre populações da Amazônia/Cerrado/Pantanal (domínio sul brasileiro, domínio boreal brasileiro e domínio sudoeste amazônico) através de corredores foram descritas para outros organismos, como serpentes (Wüster *et al*., 2005; Quijada-Mascareñas *et al*., 2007), morcegos (Martins *et al*., 2007) e borboletas (Hall e Harvey, 2002).

A Mata Atlântica (Domínio Paraná) constitui-se em uma região separada das outras regiões florestais do continente pela diagonal de formações abertas Chaco/Cerrado/Caatinga (Domínios do Sudoeste Amazônico e Chaco), que possibilita o isolamento e diferenciação de vários táxons e altos índices de endemismo (Carnaval *et al*., 2009; Vieira *et al*., 2009). Linhagens cuja diferenciação está associada à história deste bioma já foram descritas para serpentes (Puorto *et al*., 2001), lagartos (Pellegrino *et al*., 2004) e pássaros (Batalha-Filho *et al*., 2012). Nossas análises também recuperam dentro na linhagem F, além de indivíduos da Mata Atlântica, representantes de Caatinga e de Cerrado. Análises de parcimônia de endemicidade e distribuição

cladística apontam para uma relação entre Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, embora as inter-relações não estejam bem esclarecidas (Melo Santos *et al*., 2007; Zanella, 2010). Um dos modelos propostos para explicar esta relação baseia-se nos ciclos do Quaternário e propõem que no final do Pleistoceno a América do Sul era caracterizada por um clima seco, propiciando a expansão da Caatinga em regiões de Cerrado e a expansão do Cerrado em regiões de floresta (Souza *et al*., 2005; Silva, 2010).

O agrupamento I formado exclusivamente por indivíduos do chaco, *B. c. occidentalis,* é marcadamente distinto dos demais, inclusive considerando alguns caracteres fenotípicos, como o padrão de coloração e dados merísticos. Táxons de vasta distribuição e nos quais os indivíduos do chaco representam linhagens distintas das demais são relatados para roedores *Akodon* (Valdez e D'Elía, 2013) e marsupiais *Thylamys* (Braun *et al*., 2005).

A intensa fase de soerguimento dos Andes que ocorreu durante o Plioceno tardio e início do Pleistoceno (3.6 a 2.5 Ma) influenciou no soerguimento do planalto brasileiro, separando o Cerrado do Chaco (Silva, 1995), e como notado por Werneck (2012), a baixa elevação do Chaco pode contibuir para que as flutuações climáticas do Quaternário tenham afetado de forma mais pronunciada esta região do que outras regiões mais elevadas.

Dessa, forma a diversificação na região Neotropical não é encontrada em outras biotas no planeta e não existe um padrão ou processo único capaz de explicar tal fenômeno (Bush, 1994; Rull; 2011). Dentre os principais mecanismos apontados como geradores deste padrão figuram os eventos orogenéticos relacionados à formação da Cadeia dos Andes, que afetaram significativamente a geomorfologia da porção Sul do continente americano e, associado a estes, as mudanças climáticas que começaram no Neogeno e tornaram-se acentuadas no Pleistoceno (Zachos *et al.*, 2001; Antonelli *et al.*, 2009; Rull, 2011).

Essa pluralidade de mecanismos que influenciou a história evolutiva de inúmeros táxons (Batalha-Filho *et al*., 2011; Fernandes *et al.*,2014; Machado *et al*., 2014), também moldaram a atual configuração de *Boa*.

Ainda que a real importância das flutuações climáticas do Quaternário no surgimento de novas espécies seja questionada (Bennet, 2004), representam um importante papel no processo da diversificação das linhagens de *Boa,*

embora as mudanças que agora vemos nas linhagens reconhecidas no presente trabalho podem ainda não representar um processo completo de especiação, constituindo-se em espécies insipientes (De Queiroz, 2007).

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- De acordo com as análises filogenéticas, o gênero *Boa* é recuperado como monofilético, com nove linhagens;
- De acordo com as Análises de Delimitação de Espécies, as amostras analisadas de *Boa* não pertencem a uma única espécie putativa, sugerindo a existência de no mínimo quatro EPs;
- Os táxons/subespécies historicamente reconhecidos como subespécies *B. c. amarali, B. c. constrictor, B. c. imperator, B. c. longicauda, B. c. melanogaster, B. c. ortonii* e *B. c. sabogae*, não foram reconhecidos como linhagens únicas, tanto nas análises filogenéticas quanto nas análises de delimitação de espécies;
- Os táxons historicamente reconhecidos como subespécies *B. c. nebulosa, B. c. orophias e B. c. occidentalis,* foram reconhecidos como linhagens distintas, tanto nas análises filogenéticas quanto nas análises de delimitação de espécies;
- Somando-se os dados obtidos na filogenia e ADE, ao menos cinco linhagens distintas podem ser reconhecidas: *B. constrictor (sensu stricto*), *Boa occidentalis* e *Boa imperator; Boa nebulosa* e *Boa orophias*;

7 RESUMO

As serpentes que compõem o complexo *Boa constrictor* apresentam ampla distribuição por toda região Neotropical. A variação morfológica ligada à coloração e às localidades de origem fizeram com que, historicamente, fossem reconhecidas várias subespécies, embora sem consenso na literatura. Estudos prévios desenvolvidos com marcadores moleculares abordando aspectos filogenéticos e filogeográficos indicaram a existência de diversidade críptica em *Boa*. A fim de investigar as relações filogenéticas (empregando Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana), análises de tempo de divergência e delimitação de espécies (utilizando os métodos *Poisson Tree Processes*, PTP, e *Generalized Mixed Yule Coalescent*, GMYC), foram utilizadas sequências dos genes Cytb, ND4 e NTF3, e do íntron de ODC de 217 exemplares, com representantes de 10 subespécies. Os resultados filogenéticos recuperaram *Boa* como um gênero monofilético e apontaram nove linhagens. Somente as subespécies *B. c. occidentalis*, *B. c. orophias* e *B. c. nebulosa* foram recuperadas como monofiléticas. As análises de delimitação de espécies não recuperam o monofiletismo de *Boa*, sendo que em PTP foram recuperadas um mínimo de 15 (para o Sul) e máximo de 75 espécies putativas (EPs) e em GMYC foram recuperadas quatro EPs. A estimativa dos tempos de divergência revelou que essas linhagens passaram por um processo de diversificação no Plioceno e Pleistoceno. Esses resultados somados aos dados da literatura permitiram hipotetizar a existência de ao menos cinco linhagens distintas em *Boa*: *B. constrictor* (*sensu stricto*), *B. occidentalis, B. imperator, B. orophias* e *B. nebulosa,* cuja diversificação está ligada aos eventos climáticos ocorridos Quaternário e Neógeno eventos geológicos derivados do soerguimento dos Andes.

Palavras-chaves: *Boa*, marcadores moleculares, filogenia, delimitação de espécies

8 ABSTRACT

Snakes of the complex *Boa constrictor* are widely distributed in the Neotropical region. Historically, based on morphological variation and locality of origin, several subspecies have been recognized, although there are controversies concerning the number of subspecies. Previous phylogenetic and phylogeographic studies using molecular markers suggested cryptic diversity in *Boa.* Sequences of Cytb, ND4, NTF3 and ODC of 217 samples, including ten subspecies were used in order to investigate phylogenetic relationships. In this sense, it was used Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Additionally, molecular dating and species delimitation analyses (*Poisson Tree Processes*, PTP, and *Generalized Mixed Yule Coalescent*, GMYC) were performed. Phylogenetic studies recovered *Boa* as monophyletic and nine lineages. Also, *B. c. occidentalis*, *B. c. orophias,* and *B. c. nebulosa* were the only subspecies recovered as monophyletic. Species delimitation analyses did not show *Boa* as monophyletic: PTP recovered from 15 for the South to 75 putative species considering the whole distribution; GMYC recovered four putative species. Divergence time estimation revealed that lineages have diversified during Pliocene and Pleistocene. These results allowed us to hypothesize at least five distinct lineages: *B. constrictor* (*sensu stricto*), *B. occidentalis, B. imperator, B. orophias* and *B. nebulosa,* whose diversification is related to climatic events of Quaternary and geological events like uplift of Andes during Neogene.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, Adriana M. First snake record from the Sarmiento Formation at La Gran Hondonada (Chubut Province, Argentina). **Ameghiniana**, v. 49, n. 2, p. 230-235, 2012.

ALBINO, Adriana M. Morfología vertebral de Boa constrictor (Serpentes: Boidae) y la validez del género mioceno Pseudoepicrates Auffenberg, 1923. **Ameghiniana**, v. 48, n. 1, p. 53-62, 2011.

ALBINO, Adriana M.; CARLINI, Alfredo A. First Record of Boa constrictor (Serpentes, Boidae) in the Quaternary of South America. **Journal of Herpetology**, v. 42, n. 1, p. 82-88, 2008.

ALBINO, Adriana Maria. Snakes from the Paleocene and Eocene of Patagonia (Argentina): paleoecology and coevolution with mammals. **Historical Biology**, v. 7, n. 1, p. 51-69, 1993.

ANTONELLI, Alexandre et al. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 24, p. 9749-9754, 2009.

ARÈVALO, Elisabeth; DAVIS, Scott K.; SITES, Jack W. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the Sceloporus grammicus complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. **Systematic Biology**, v. 43, n. 3, p. 387-418, 1994.

AUFFENBERG, Walter. **The fossil snakes of Florida**. Tulane University, 1963.

BALLARD, J. William O.; RAND, David M. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. Annual Review of Ecology, **Evolution, and Systematics,** p. 621-642, 2005.

BALLARD, J. William O.; WHITLOCK, Michael C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular ecology**, v. 13, n. 4, p. 729-744, 2004.

BATALHA-FILHO, Henrique; CABANNE, Gustavo Sebastián; MIYAKI, Cristina Yumi. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 3, p. 892-902, 2012.

BEGOTTI, R. A.; MARCOS-FILHO, A. Fatal attack on an adult Chestnut-fronted Macaw Ara severus by a Boa constrictor in the Brazilian Amazon. **Cotinga**, v. 34, p. 106-107, 2012.

BENNETT, Keith D. Continuing the debate on the role of Quaternary environmental change for macroevolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1442, p. 295-303, 2004.

BERGER, Simon A.; KROMPASS, Denis; STAMATAKIS, Alexandros. Performance, accuracy, and web server for evolutionary placement of short sequence reads under maximum likelihood. **Systematic biology**, p. syr010, 2011.

BIRKY JR, C. William. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. **Annual review of genetics**, v. 35, n. 1, p. 125-148, 2001.

BOBACK, Scott M. A morphometric comparison of island and mainland boas (Boa constrictor) in Belize. **Copeia**, v. 2006, n. 2, p. 261-267, 2006.

BOBACK, Scott M. Natural history and conservation of island boas (Boa constrictor) in Belize. **Copeia,** v. 2005, n. 4, p. 879-884, 2005.

BONNY, Klaus. Gattung Boa. Kirschner & Seufer, 2007.

BRAUN, Janet K. et al. Phylogenetic and biogeographic relationships of mouse opossums Thylamys (Didelphimorphia, Didelphidae) in southern South America. **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 1, p. 147-159, 2005.

BREMER, Birgitta et al. More characters or more taxa for a robust phylogeny—case study from the coffee family (Rubiaceae). **Systematic Biology**, v. 48, n. 3, p. 413-435, 1999.

BROWN, Samuel DJ et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.

BROWN, Samuel DJ et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.

BROWN, Wesley M.; GEORGE, Matthew; WILSON, Allan C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.

BRYSON JR, Robert W. et al. Elucidation of cryptic diversity in a widespread Nearctic treefrog reveals episodes of mitochondrial gene capture as frogs diversified across a dynamic landscape. **Evolution**, v. 64, n. 8, p. 2315-2330, 2010.

BRYSON, R. W. et al. Multilocus species delimitation in the Crotalus triseriatus species group (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), with the description of two new species. **Zootaxa,** v. 3826, n. 3, p. 475-496, 2014.

BRYSON, Robert W. et al. Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the Crotalus triseriatus species group of montane rattlesnakes. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 4, p. 697-710, 2011.

BURBRINK, Frank T. Inferring the phylogenetic position of Boa constrictor among the Boinae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 167-180, 2005.

BURBRINK, Frank T.; LAWSON, Robin; SLOWINSKI, Joseph B. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (Elaphe obsoleta): a critique of the subspecies concept. **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 2107-2118, 2000.

BUSH, Mark B. Amazonian speciation: a necessarily complex model. **Journal of Biogeography**, p. 5-17, 1994.

CAMARGO, Arley; JACK JR. SITES. **Species delimitation: a decade after the renaissance**. INTECH Open Access Publisher, 2013.

CARD, Daren C. et al. Phylogeographic and population genetic analyses reveal multiple species of Boa and independent origins of insular dwarfism. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 102, p. 104-116, 2016.

CARNAVAL, Ana Carolina et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785-789, 2009.

CARSTENS, Bryan C.; DEWEY, Tanya A. Species delimitation using a combined coalescent and information-theoretic approach: an example from North American Myotis bats. **Systematic Biology**, p. syq024, 2010.

CASTOE, Todd A. et al. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 88-103, 2009.

CEDIEL, Fabio; SHAW, Robert P.; CCERES, Carlos. **Tectonic assembly of the northern Andean Block**. 2003.

CHIARAVIGLIO, Margarita et al. Intrapopulation variation in life history traits of Boa constrictor occidentalis in Argentina. **Amphibia-Reptilia**, v. 24, n. 1, p. 65-74, 2003.

CISNEROS-HEREDIA, Diego F.; LEÓN-REYES, Andrés; SEGER, Sylvia. Boa constrictor predation on a titi monkey, Callicebus discolor. **Neotropical Primates**, v. 13, n. 3, p. 11-12, 2005.

COCHRAN, Doris M. Notes on the herpetology of the Pearl Islands, Panama. **Smithsonian Miscellaneous Collections** v. 106, n.4 p. 1-8. 1946.

COPE, E. D. Synopsis of the cold blooded vertebrata, procured by Prof. James Orton during his exploration of Peru in 1876-77. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 17, n. 100, p. 33-49, 1877.

COSTA, H. C. ; BERNILS, R. S. . Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, p. 75-93, 2015.

COTTONTAIL, Veronika M. et al. High local diversity of Trypanosoma in a common bat species, and implications for the biogeography and taxonomy of the T. cruzi clade. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108603, 2014.

DAUDIN, François Marie; SONNINI, Charles Sigisbert. **Histoire naturelle, generale et particulière, des reptiles**. de l'imprimerie de F. Dufart, 1803.

DÁVALOS, Liliana M. et al. Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. **Biological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 991-1024, 2012.

DAZA, Juan M.; CASTOE, Todd A.; PARKINSON, Christopher L. Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. **Ecography**, v. 33, n. 2, p. 343-354, 2010.

De QUEIROZ, K. Different species problems and their resolution. ***BioEssays***, *27*(12), 1263-1269.2005b.

DE QUEIROZ, K. **The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. Endless forms: species and speciation**, p. 57-75, 1998.

DE QUEIROZ, Kevin. Ernst Mayr and the modern concept of species. **Proceedings of the National Academy of Science**s, v. 102, n. suppl 1, p. 6600-6607, 2005a.

DE QUEIROZ, Kevin. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

DEGNAN, James H.; ROSENBERG, Noah A. Discordance of species trees with their most likely gene trees. **PLoS Genet**, v. 2, n. 5, p. e68, 2006.

DEVITT, Thomas J. Phylogeography of the Western Lyresnake (Trimorphodon biscutatus): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic–Neotropical transition. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4387-4407, 2006.

DRUMMOND, A.J., SUCHARD, M.A., XIE, D., Rambaut, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 **Molecular Biology And Evolution n.** 29 p. 1969-1973. 2012.

ENCE, Daniel D.; CARSTENS, Bryan C. SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 473-480, 2011.

FARRIS, David W. et al. Fracturing of the Panamanian Isthmus during initial collision with South America. **Geology**, v. 39, n. 11, p. 1007-1010, 2011.

FERRARI, Luca et al. The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. **Tectonophysics**, v. 522, p. 122-149, 2012.

FERRARI, Stephen F. et al. Fatal Attack of a Boa constrictoron a Bearded Saki (Chiropotes satanas utahicki). **Folia Primatologica**, v. 75, n. 2, p. 111-113, 2004.

FELENSTEIN, Joseph. **Inferring phylogenies**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.

FORCART, Lothar. Nomenclature remarks on some generic names of the snake family Boidae. **Herpetologica**, v. 7, n. 4, p. 197-199, 1951.

FOUQUET, Antoine et al. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, v. 31, n. 04, p. 361-373, 2015.

FRAZÃO, Annelise; DA SILVA, Hélio Ricardo; DE MORAES RUSSO, Claudia Augusta. The Gondwana Breakup and the History of the Atlantic and Indian Oceans Unveils Two New Clades for Early Neobatrachian Diversification. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143926, 2015.

GARZIONE, Carmala N. et al. Rise of the Andes. **science**, v. 320, n. 5881, p. 1304-1307, 2008.

GATESY, John; DESALLE, Rob; WAHLBERG, Niklas. How many genes should a systematist sample? Conflicting insights from a phylogenomic matrix characterized by replicated incongruence. Systematic Biology, v. 56, n. 2, p. 355-363, 2007.

GOLOBOFF, Pablo A.; FARRIS, James S.; NIXON, Kevin C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24, n. 5, p. 774-786, 2008.

GREEN, S.E.W. **Evolutionary biology and conservation of Hog Island Boa constrictor**. PhD Thesis, University of Kent, Canterbury, UK. 2011.

GREGORY-WODZICKI, Kathryn M. Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. **Geological Society of America Bulletin**, v. 112, n. 7, p. 1091-1105, 2000.

GROENEVELD, Linn F. et al. Species delimitation in lemurs: multiple genetic loci reveal low levels of species diversity in the genus Cheirogaleus. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.

HAFFER, J.; PRANCE, G. T. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. **Amazoniana**, v. 16, n. 3, p. 579-607, 2001.

HAFFER, Jürgen. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 451-476, 1997.

HAFFER, Jürgen. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 917-947, 2008.

HALL, Jason PW; HARVEY, Donald J. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riodinid butterflies. **Evolution**, v. 56, n. 7, p. 1489-1497, 2002.

HART, Michael W.; SUNDAY, Jennifer. Things fall apart: biological species form unconnected parsimony networks. **Biology Letters**, v. 3, n. 5, p. 509-512, 2007.

HAUG, Gerald H.; TIEDEMANN, Ralf. Effect of the formation of the Isthmus of Panama on Atlantic Ocean thermohaline circulation. Nature, v. 393, n. 6686, p. 673-676, 1998.

HAUSDORF, Bernhard. Progress toward a general species concept. **Evolution,** v. 65, n. 4, p. 923-931, 2011.

HEAD, J.J., BLOCH, J.I., et al. Cranial osteology, body size, systematics, and ecology of the giant Paleocene snake Titanoboa cerrejonensis. **Journal of Vertebrate Paleontology**, 33(suppl.):140-141. 2013.

HEAD, Jason J. et al. Giant boid snake from the Palaeocene neotropics reveals hotter past equatorial temperatures. **Nature,** v. 457, n. 7230, p. 715-717, 2009.

HEAD, Jason J. Fossil calibration dates for molecular phylogenetic analysis of snakes 1: Serpentes, Alethinophidia, Boidae, Pythonidae. **Palaeontologia Electronica**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2015.

HEAD, Jason J. et al. Fossil evidence for earliest Neogene American faunal interchange: Boa (Serpentes, Boinae) from the early Miocene of Panama. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 32, n. 6, p. 1328-1334, 2012. HEDGES, S. Blair. PALEOGEOGRAPHY OF THE ANTILLES AND ORIGIN OF WEST INDIAN TERRESTRIAL VERTEBRATES 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 93, n. 2, p. 231-244, 2006.

HEDGES, S. Blair. Vicariance and dispersal in Caribbean biogeography. **Herpetologica,** p. 466-473, 1996.

HEDGES, S. Blair; HASS, Carla A.; MAXSON, Linda R. Caribbean biogeography: molecular evidence for dispersal in West Indian terrestrial vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1909-1913, 1992.

HEDGES, S. Blair; DUDLEY, Joel; KUMAR, Sudhir. TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. **Bioinformatics**, v. 22, n. 23, p. 2971-2972, 2006.

HEISE, Philip J. et al. Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 259-265, 1995.

HELED, Joseph; DRUMMOND, Alexei J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 3, p. 570-580, 2010.

HENDERSON, Robert W et al. Ecological correlates and patterns in the distribution of Neotropical boines (Serpentes: Boidae): a preliminary assessment. **Herpetological Natural History**, v. 3, p. 1, 1995.

HENDERSON, Robert W.; POWELL, Robert (Ed.). **Biology of the Boas and Pythons**. Eagle Mountain Publishing, Utah, USA, 2007.

HSIOU, Annie S.; ALBINO, Adriana M. Presence of the genus Eunectes (Serpentes, Boidae) in the Neogene of southwestern Amazonia, Brazil. **Journal of Herpetology,** v. 43, n. 4, p. 612-619, 2009.

HYNKOVÁ, Ivana; STAROSTOVÁ, Zuzana; FRYNTA, Daniel. Mitochondrial DNA variation reveals recent evolutionary history of main Boa constrictor clades. **Zoological science**, v. 26, n. 9, p. 623-631, 2009.

IZQUIERDO-CARRASCO, Fernando; SMITH, Stephen A.; STAMATAKIS, Alexandros. Algorithms, data structures, and numerics for likelihood-based phylogenetic inference of huge trees. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KLUGE, Arnold G. **Boine snake phylogeny and research cycles**. Museum of Zoology, the University of Michigan, 1991.

KLUGE, Arnold G. Relationships of the Cenozoic boine snakes Paraepicrates and Pseudoepicrates. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 8, n. 2, p. 229-230, 1988.

KNOWLES, L. Lacey; CARSTENS, Bryan C. Delimiting species without monophyletic gene trees. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 887-895, 2007.

KUBATKO, Laura S.; GIBBS, H. Lisle; BLOOMQUIST, Erik W. Inferring species-level phylogenies and taxonomic distinctiveness using multilocus data in Sistrurus rattlesnakes. **Systematic Biology**, p. syr011, 2011.

KUMAR, Sudhir, STECHER, Glen, Koichiro Tamura, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology Evolution. v. 33 n. 7 p.1870–1874. 2016.

LANGHAMMER, James K. **A new subspecies of boa constrictor, boa constrictor melanogaster, from Ecuador (serpentes: boidae)**. 1985.

LANZA, Benedetto; NISTRI, Annamaria. Somali Boidae (genus Eryx Daudin 1803) and Pythonidae (genus Python Daudin 1803)(Reptilia Serpentes). **Tropical Zoology,** v. 18, n. 1, p. 67-136, 2005.

LAZELL, James D. The Lesser Antillean Representative of Bothrops and Constrictor. The Museum, 1964.

LEACHÉ, Adam D.; FUJITA, Matthew K. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (Hemidactylus fasciatus). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1697, p. 3071-3077, 2010.

LEAVITT, Steven D.; MOREAU, Corrie S.; LUMBSCH, H. Thorsten. The dynamic discipline of species delimitation: progress toward effectively recognizing species boundaries in natural populations. In: Recent Advances in Lichenology. Springer India, 2015. p. 11-44.

LINDER, H. Peter; HARDY, Christopher R.; RUTSCHMANN, Frank. Taxon sampling effects in molecular clock dating: an example from the African Restionaceae. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 35, n. 3, p. 569-582, 2005.

LUNDBERG, John G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. 1998.

LYNCH, V.J., WAGNER, G.P. Did egg-laying boas break Dollo's law? Phylogenetic evidence for reversal to oviparity in sand boas (Eryx: Boidae). **Evolution** v. 64 p. 207–16. 2010.

MACHADO, Taís; SILVA, Vinícius X.; SILVA, Maria José de J. Phylogenetic relationships within Bothrops neuwiedi group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 71, p. 1-14, 2014.

MALLET, James. Subspecies, semispecies, superspecies. **Encyclopaedia of biodiversity**, v. 5, p. 1-5, 2007.

MARTINS, F. M. et al. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, Desmodus rotundus (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, n. 4, p. 372-378, 2007.

MAYDEN, Richard L. **A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem**. 1997.

MAYDEN, Richard L. Consilience and a hierarchy of species concepts: advances toward closure on the species puzzle. **Journal of Nematology**, v. 31, n. 2, p. 95, 1999.

MCDIARMID, Roy W. et al. Snake species of the world: a taxonomic and geographic reference. Washington, DC: Herpetologists' League, 1999.

MELO SANTOS, André M. et al. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 3, p. 437-446, 2007.

MILLER, Matthew J. et al. Out of Amazonia again and again: episodic crossing of the Andes promotes diversification in a lowland forest flycatcher. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1639, p. 1133-1142, 2008.

MILLER, Wade E. The Late Pliocene Las Tunas local fauna from southernmost Baja California, Mexico. **Journal of Paleontology**, p. 762-805, 1980.

MONAGHAN, Michael T. et al. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic biology**, p. syp027, 2009.

MORITZ, Craig. Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. v.9 n.10 p. 373-5. 1994.

MORRONE, Juan J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, n. 1, p. 1-110, 2014a.

MORRONE, Juan J. Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. **Cladistics**, v. 30, n. 2, p. 202-214, 2014.

MULCAHY, Daniel G. Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (Hypsiglena torquata): revisiting the subspecies concept. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 46, n. 3, p. 1095-1115, 2008.

NOONAN, Brice P.; CHIPPINDALE, Paul T. Dispersal and vicariance: the complex evolutionary history of boid snakes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 40, n. 2, p. 347-358, 2006a.

NOONAN, Brice P.; CHIPPINDALE, Paul T. Vicariant origin of Malagasy reptiles supports Late Cretaceous Antarctic land bridge. **The American Naturalist**, v. 168, n. 6, p. 730-741, 2006b.

O'DEA, Aaron et al. Formation of the Isthmus of Panama. **Science Advances**, v. 2, n. 8, p. e1600883, 2016.

O'MEARA, B. C. New Heuristic Methods for Joint Species Delimitation and Species Tree Inference. **Systematic Biology**.v. 59 p. 59-73. 2010.

ONARY-ALVES, Silvio Y.; HSIOU, Annie S.; RINCÓN, Ascanio D. The northernmost South American fossil record of Boa constrictor (Boidae, Boinae) from the Plio–Pleistocene of El Breal de Orocual (Venezuela). **Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology**, p. 1-8, 2016.

PADIAL, Jose M.; GRANT, Taran; FROST, Darrel R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. **Zootaxa,** v. 3825, n. 1, p. 1-132, 2014.

PATTON, James L.; DA SILVA, Maria Nazareth F.; MALCOLM, Jay R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, p. 1-306, 2000.

PELLEGRINO, Katia et al. Phylogeography and species limits in the Gymnodactylus darwinii complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 1, p. 13-26, 2005.

PENZ, Carla et al. Butterfly dispersal across Amazonia and its implication for biogeography. **Ecography**, v. 38, n. 4, p. 410-418, 2015.

PETERS, James A. et al. **Catalogue of the neotropical Squamata**. Smithsonian Inst Pr, 1986.

PETERS, James A.; OREJAS-MIRANDA, B. **Catalogue of the neotropical squamata: Part I. Snakes**. US. Nat. Mus. Bull, v. 297, 1970.

PHILIPPE, Hervé et al. Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. **PLoS Biol,** v. 9, n. 3, p. e1000602, 2011.

PICK, K. S. et al. Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects nonbilaterian relationships. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 9, p. 1983-1987, 2010.

PIZZATTO do Prado, Ligia. Ecomorfologia e estrategias reprodutivas nos Boidae (Serpentes), com enfase nas especies neotropicais. 2006.

PIZZATTO, Lígia; MARQUES, Otavio AV; FACURE, Kátia. Food habits of Brazilian boid snakes: overview and new data, with special reference to Corallus hortulanus. **Amphibia-Reptilia**, v. 30, n. 4, p. 533-544, 2009.

PONS, Joan et al. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic biology,** v. 55, n. 4, p. 595-609, 2006.

PRICE, R. M.; RUSSO, P. Revisionary comments on the genus Boa with the description of a new subspecies of Boa constrictor from Peru. **The Snake**, v. 23, n. 1, p. 29-35, 1991.

PUILLANDRE, Nicolas et al. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. Molecular ecology, v. 21, n. 11, p. 2671-2691, 2012.

PUORTO, Giuseppe et al. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of Bothrops pradoi (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, n. 4, p. 527-538, 2001.

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

PYRON, R. Alexander; REYNOLDS, R. Graham; BURBRINK, Frank T. A taxonomic revision of boas (Serpentes: Boidae). Zootaxa, v. 3846, n. 2, p. 249-260, 2014.

QUICK, John S. et al. Recent occurrence and dietary habits of Boa constrictor on Aruba, Dutch West Indies. Journal of Herpetology, v. 39, n. 2, p. 304-307, 2005.

QUIJADA-MASCAREÑAS, ADRIAN J. et al. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (Crotalus durissus complex) as an example. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 8, p. 1296-1312, 2007.

RAGE, Jean-Claude. Fossil snakes from the Palaeocene of São José de Itaboraí, Brazil. Part II. Boidae. **Palaeovertebrata**, v. 30, n. 3-4, p. 111-150, 2001.

RAGE, Jean-Claude. Mesozoic and Cenozoic squamates of Europe. **Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments**, v. 93, n. 4, p. 517-534, 2013.

REED, Robert N.; RODDA, Gordon H. Giant constrictors: biological and management profiles and an establishment risk assessment for nine large species of pythons, anacondas, and the boa constrictor. US Geological Survey, 2009.

REYNOLDS, R. Graham et al. Molecular phylogeny and historical biogeography of West Indian boid snakes (Chilabothrus). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 68, n. 3, p. 461-470, 2013.

REYNOLDS, R. Graham; NIEMILLER, Matthew L.; REVELL, Liam J. Toward a Tree-of-Life for the boas and pythons: Multilocus species-level phylogeny with unprecedented taxon sampling. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** v. 71, p. 201-213, 2014.

ROCHA-SANTOS, Gilson da; BARBIER, Eder; BORDIGNON, Marcelo Oscar. Sweet trap: Boa constrictor (Serpentes: Boidae) preying on passerines on Cecropia pachystachya (Urticales: Cecropiaceae) in fruiting period. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 2, p. 1-4, 2014.

ROKAS, Antonis et al. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. Nature, v. 425, n. 6960, p. 798-804, 2003.

ROKAS, Antonis; CARROLL, Sean B. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 5, p. 1337-1344, 2005.

RUANE, Sara et al. Coalescent species delimitation in milksnakes (genus Lampropeltis) and impacts on phylogenetic comparative analyses. **Systematic Biology**, p. syt099, 2013.

RULL, Valentí. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 26, n. 10, p. 508-513, 2011.

SANTOYO-BRITO, Enrique. Análisis taxonómico de las subespecies de Boa constrictor descritas para territorio mexicano. **Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana**, v. 15, n. 2, p. 45-47, 2007.

SATLER, Jordan D.; CARSTENS, Bryan C.; HEDIN, Marshal. Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, Aliatypus). **Systematic Biology**, v. 62, n. 6, p. 805-823, 2013.

SAVAGE, Jay M. **The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas**. University of Chicago press, 2002.

SCANFERLA, Agustin; AGNOLÍN, Federico L. NUEVOS APORTES AL CONOCIMIENTO DE LA HERPETOFAUNA DE LA FORMACIÓN CERRO AZUL (MIOCENO SUPERIOR), PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA. **Papéis Avulsos de Zoologia** (São Paulo), v. 55, n. 23, p. 323-333, 2015.

SELVATTI, Alexandre Pedro; GONZAGA, Luiz Pedreira; DE MORAES RUSSO, Claudia Augusta. A Paleogene origin for crown passerines and the diversification of the Oscines in the New World. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 88, p. 1-15, 2015.

SHIRLEY, Matthew H. et al. Rigorous approaches to species delimitation have significant implications for African crocodilian systematics and conservation. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1776, p. 20132483, 2014.

SIMPSON, George Gaylord. **Principles of animal taxonomy**. Columbia University Press, 1961.

SITES, Jack W.; MARSHALL, Jonathon C. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 9, p. 462-470, 2003.

SITES, Jack W.; MARSHALL, Jonathon C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 199-227, 2004.

SLOWINSKI, Joseph B., PAGE, Roderic D. M. How should species phylogenies be inferred from sequence data. Systematic Biolology.v. 48 p. 814–825.1999 .

Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2003). Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*, *18*(2), 256-267.

SOM, Anup. Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence. **Briefings in bioinformatics**, p. bbu015, 2014.

SORRELL, G. G. et al. Boa constrictor (Boa constrictor): foraging behavior. **Herpetological Review**, v. 42, n. 2, p. 281-281, 2011.

STAMATAKIS, Alexandros. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics,** v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

STEEL, Mike; MCKENZIE, Andy. Properties of phylogenetic trees generated by Yule-type speciation models. **Mathematical biosciences**, v. 170, n. 1, p. 91-112, 2001.

STULL, O.G. Five new subspecies of the family Boidae. **Occasional Papers of the Boston Society of Natural History v.** 8 p. 25–29. 1932.

SUÁREZ-ATILANO, Marco; BURBRINK, Frank; VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, Ella. Phylogeographical structure within Boa constrictor imperator across the lowlands and mountains of Central America and Mexico. **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 12, p. 2371-2384, 2014.

TAVARÉ, Simon et al. Inferring coalescence times from DNA sequence data. **Genetics,** v. 145, n. 2, p. 505-518, 1997.

TAYLOR, John W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

TEIXEIRA, Danilo Simonini et al. Fatal attack on black-tufted-ear marmosets (Callithrix penicillata) by a Boa constrictor: a simultaneous assault on two juvenile monkeys. **Primates,** v. 57, n. 1, p. 123-127, 2016.

TEMPLETON, Alan R.; CRANDALL, Keith A.; SING, Charles F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics,** v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.

UETZ, P., FREEED, P., HOSEK, J. The Reptile Database, http://www.reptile-database.org, accessed 20/08/2016.

UETZ, P.; HALLERMANN, J. How many species. **THE REPTILE database. Disponível em:< http://www. reptile-database. org/db-info/SpeciesStat. html>. Acesso em 20/08/2016**, v. 10, 2013.

UKUWELA, Kanishka DB et al. Molecular evidence that the deadliest sea snake Enhydrina schistosa (Elapidae: Hydrophiinae) consists of two convergent species. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 66, n. 1, p. 262-269, 2013.

VALDEZ, Lourdes; D'ELÍA, Guillermo. Differentiation in the Atlantic Forest: phylogeography of Akodon montensis (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia. **Journal of Mammalogy**, v. 94, n. 4, p. 911-922, 2013.

VANZOLINI, P. E. Fossil snakes and lizards from the lower Miocene of Florida. **Journal of Paleontology**, p. 452-457, 1952.

VENCES, Miguel et al. Phylogeny of South American and Malagasy boine snakes: molecular evidence for the validity of Sanzinia and Acrantophis and biogeographic implications. **Copeia,** v. 2001, n. 4, p. 1151-1154, 2001.

VENCES, MIGUEL; GLAW, FRANK. Phylogeography, systematics and conservation status of boid snakes from Madagascar (Sanzinia and Acrantophis). **SALAMANDRA-BONN**-, v. 39, n. 3/4, p. 181-206, 2003.

VIEIRA, Marcus V. et al. Land use vs. fragment size and isolation as determinants of small mammal composition and richness in Atlantic Forest remnants. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1191-1200, 2009.

WAGNER, D. **Boas- A complete pet ower´s manual.** New York: Barron´s Educational Series, 2006. p.53-89.

WALLACE, Alfred R. On the monkeys of the Amazon. **Journal of Natural History**, v. 14, n. 84, p. 451-454, 1854.

WALLACH, Van; WILLIAMS, Kenneth L.; BOUNDY, Jeff. Snakes of the world: a catalogue of living and extinct species. **CRC Press**, 2014.

WALSH, P. Sean; METZGER, David A.; HIGUCHI, Russell. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques,** v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.

WENDEL, Jonathan F.; DOYLE, Jeff J. **Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution**. In: Molecular systematics of plants II. Springer US, p. 265-296. 1998.

WERNECK, Fernanda P. **Diversification and Conservation in the South American Dry Biomes: Distribution Modeling and Multilocus Lizard Phylogeography**. BRIGHAM YOUNG UNIVERSITY, 2012.

WIENS, John J. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 875-878, 2007.

WILSON, LARRY D., MEYER, John R. **The snakes of Honduras**. 2a. Edición. Milwaukee Public Museum. 150pp. 1985.

WRIGHT, Melissa Jane. **Morphological clinal variation and assessment of subspecific taxonomy in Boa constrictor.** TRUMAN STATE UNIVERSITY, 2012.

WÜSTER, Wolfgang et al. Snakes across the Strait: trans-Torresian phylogeographic relationships in three genera of Australasian snakes (Serpentes: Elapidae: Acanthophis, Oxyuranus, and Pseudechis). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2005.

YANG, Ziheng; RANNALA, Bruce. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9264-9269, 2010.

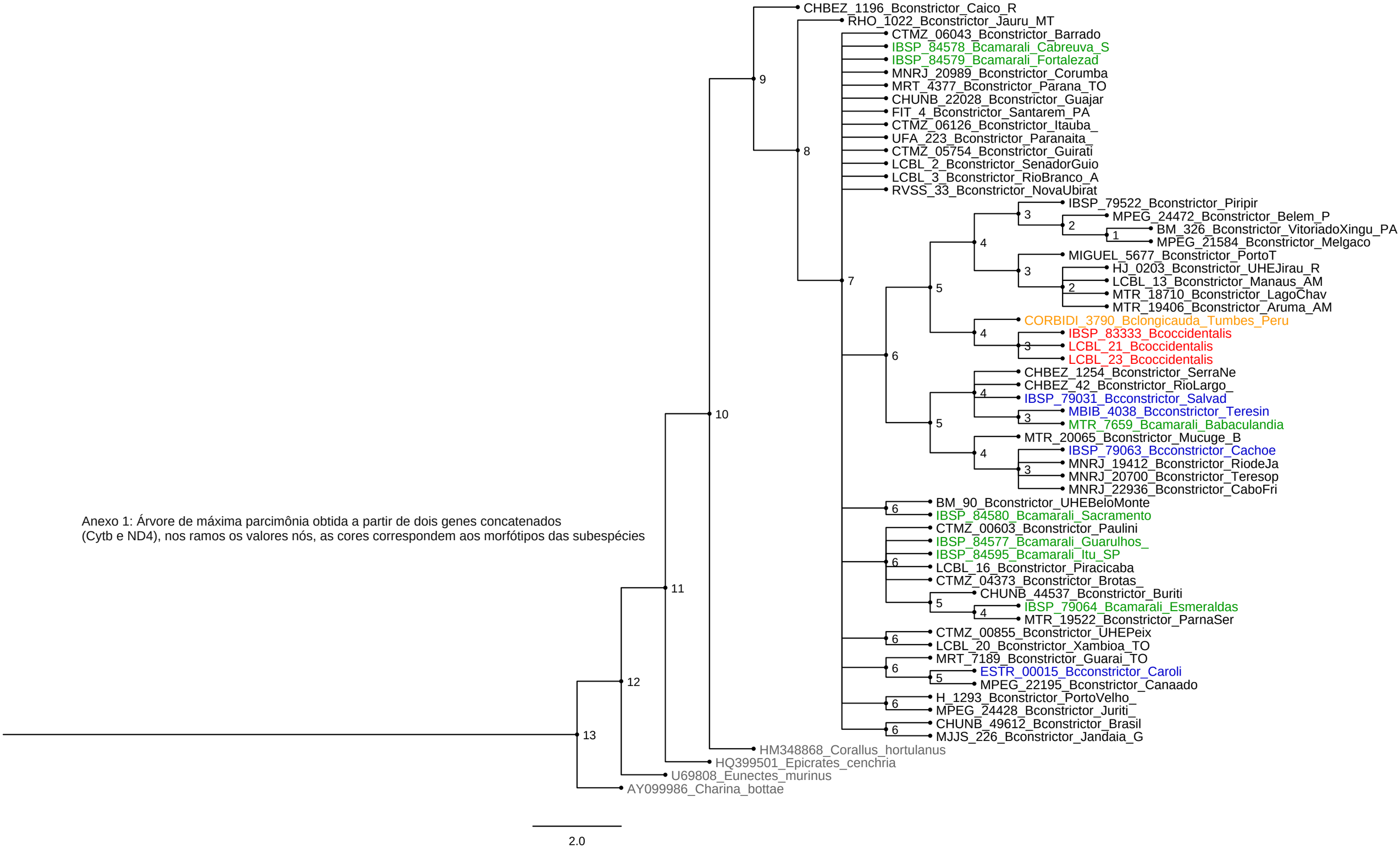
YODER, Anne D.; YANG, Ziheng. Divergence dates for Malagasy lemurs estimated from multiple gene loci: geological and evolutionary context. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 757-773, 2004.

ZACHOS, James et al. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 686-693, 2001.

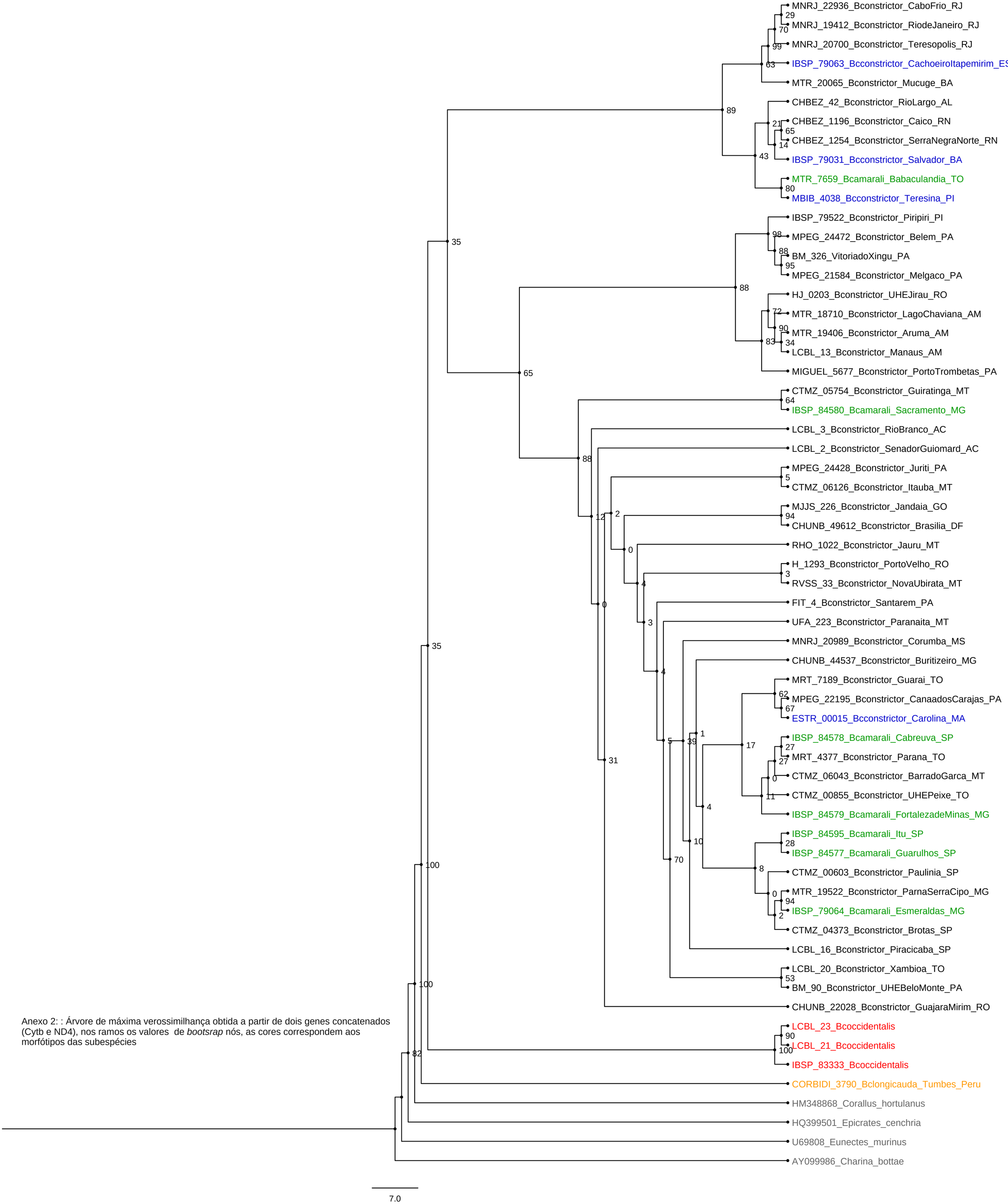
ZHANG, Chi et al. Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. **Systematic Biology**, p. syr071, 2011.

ZHANG, Jiajie et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869-2876, 2013.

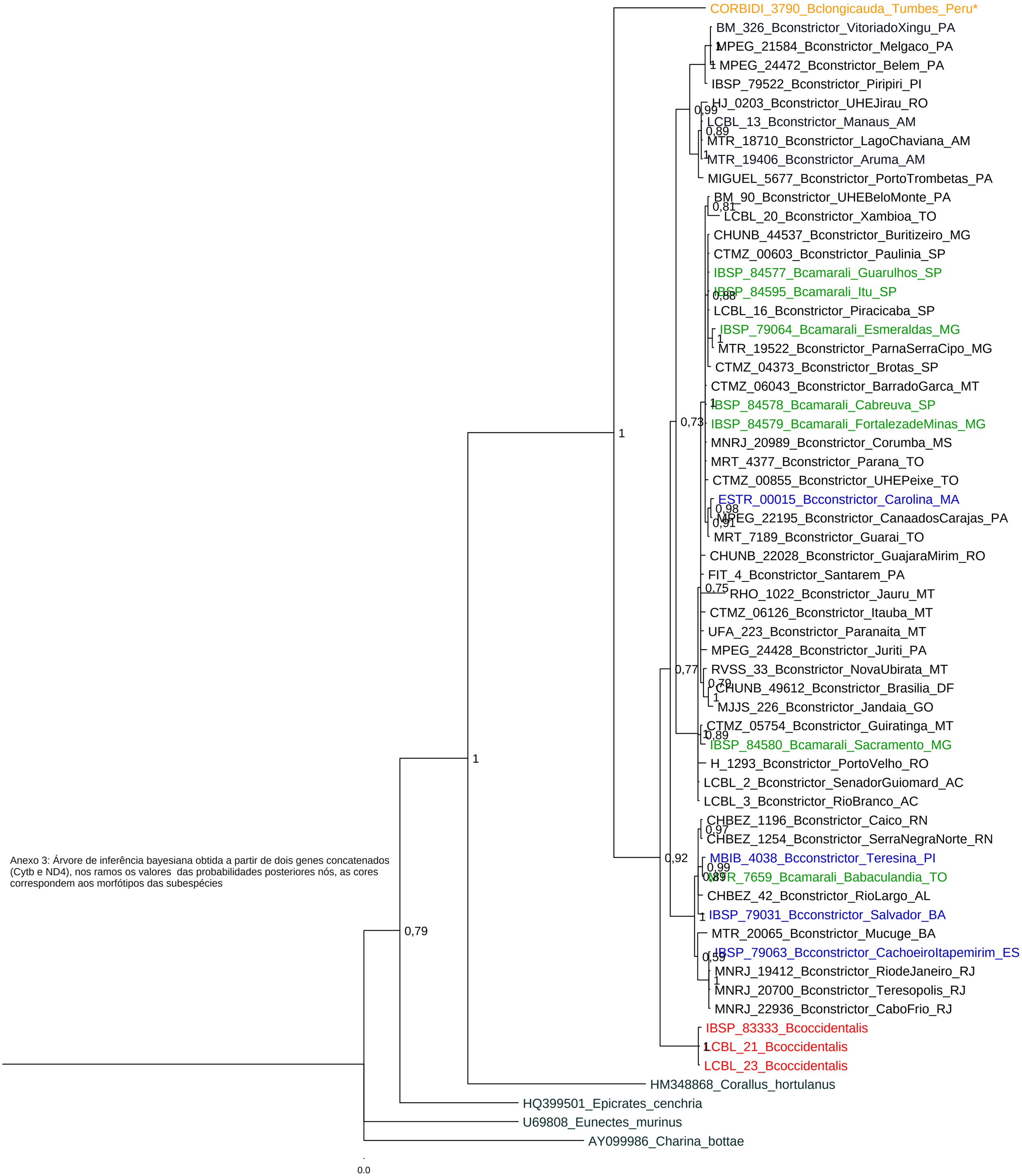
10 ANEXOS



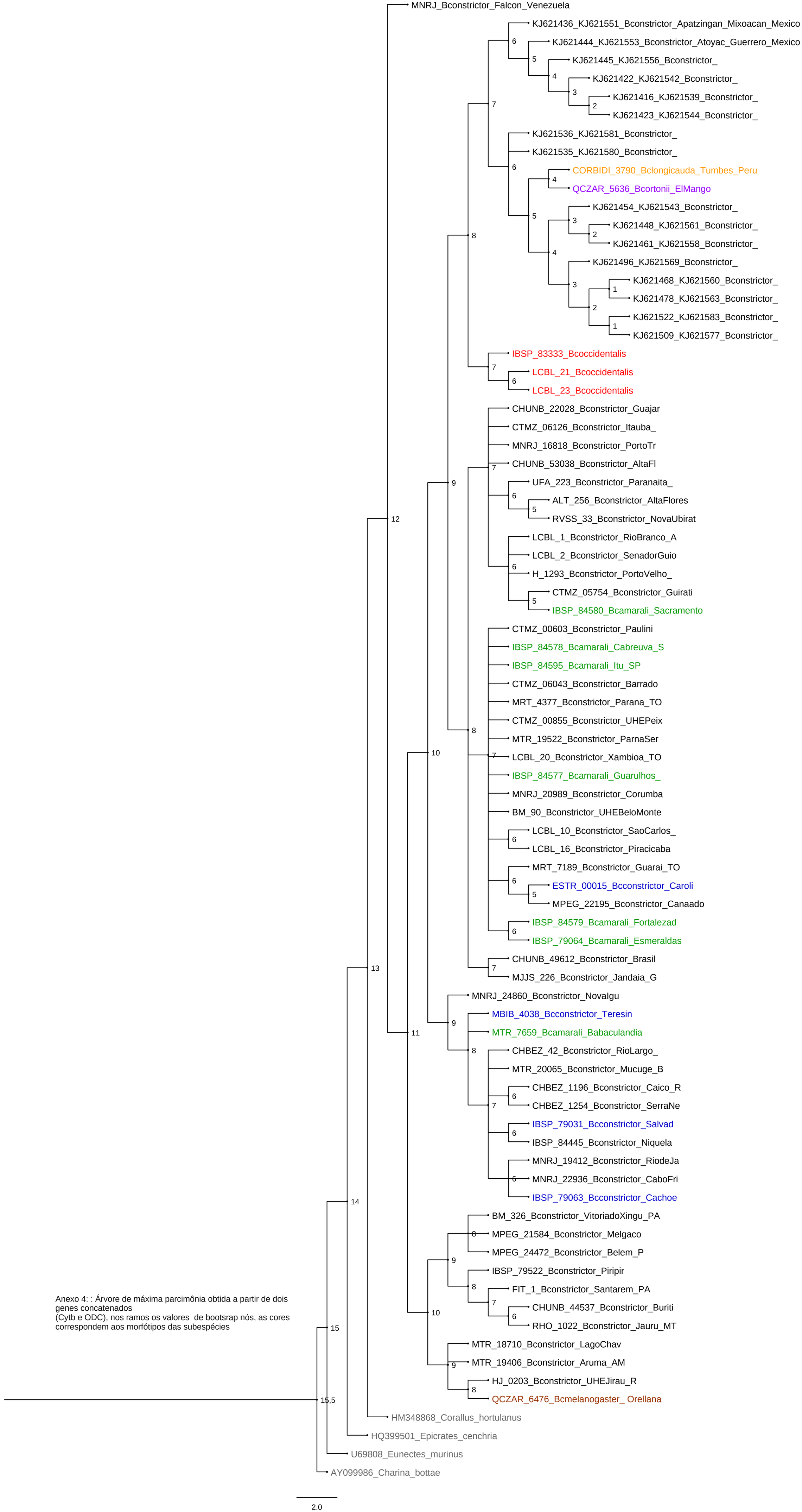
Anexo 1: Árvore de máxima parcimônia obtida a partir de dois genes concatenados (Cytb e ND4), nos ramos os valores nós, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies



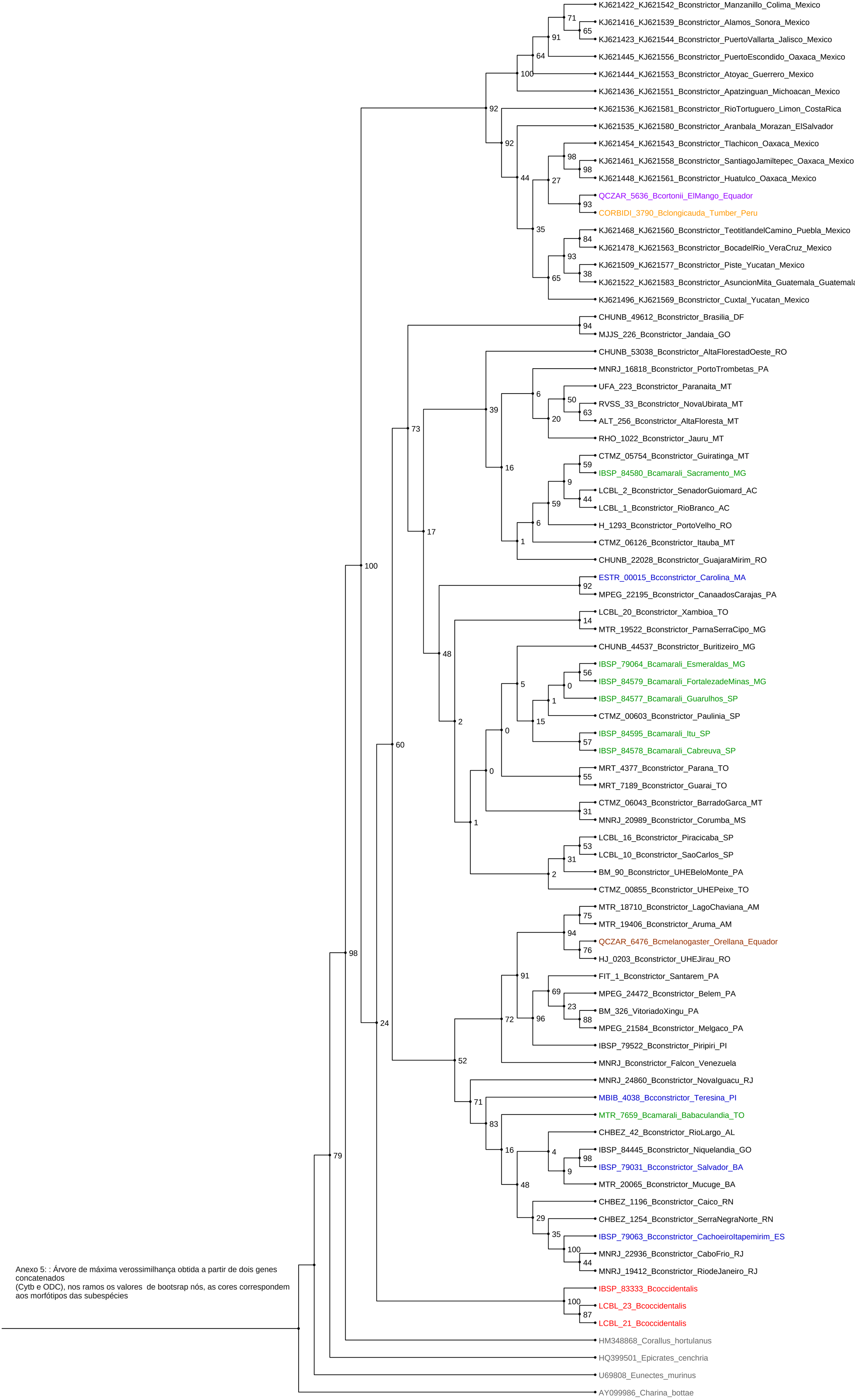
Anexo 2: : Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de dois genes concatenados (Cytb e ND4), nos ramos os valores de *bootsrap* nós, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies



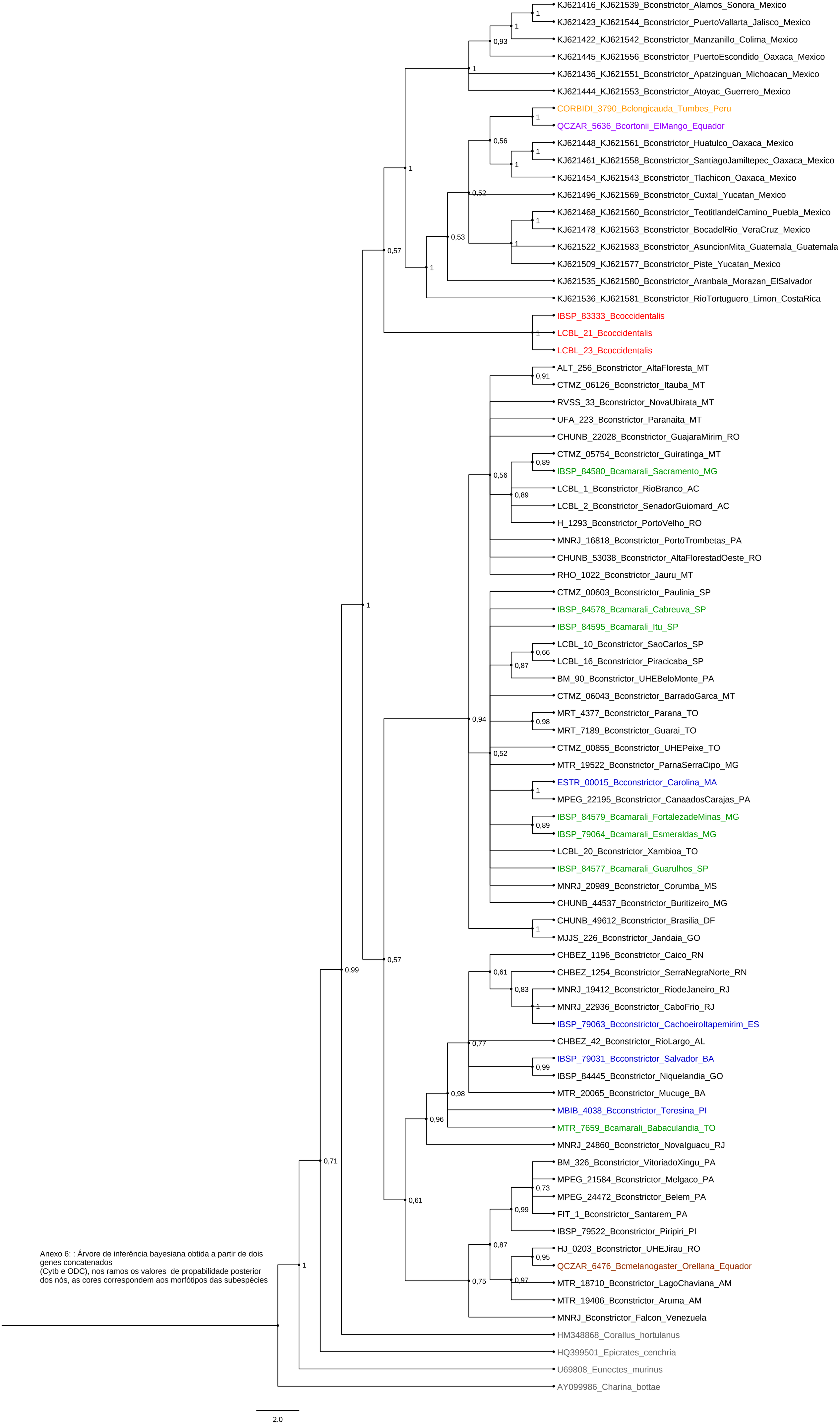
Anexo 3: Árvore de inferência bayesiana obtida a partir de dois genes concatenados (Cytb e ND4), nos ramos os valores das probabilidades posteriores nós, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies



Anexo 4: : Árvore de máxima parcimônia obtida a partir de dois genes concatenados
(Cytb e ODC), nos ramos os valores de bootsrap nós, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies



Anexo 5: : Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de dois genes concatenados
(Cytb e ODC), nos ramos os valores de bootsrap nós, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies



Anexo 6: : Árvore de inferência bayesiana obtida a partir de dois genes concatenados
(Cytb e ODC), nos ramos os valores de propabilidade posterior dos nós, as cores correspondem aos morfótipos das subespécies

Anexos 7, 8, 9 e 10

Resultado de Delimitação de Espécies

Abaixo segue a listagem com os resultados da análise de delimitação de espécie pelo método PTP. Antes de cada listagem, aparece a matriz e o método pelo qual foi feita a árvore de entrada (MV ou IB), seguido do número de espécies putativas recuperadas e seus respectivos valores de suporte.

ANEXO 7 - Matriz: Cytb, Árvore de entrada: MV

Espécie 1 (support = 1.000)
KF576731_Bcnebulosa

Espécie 2 (support = 1.000)
KF576734_Bcorophias

Espécie 3 (support = 1.000)
CHUNB_61848_Bconstrictor_Piripiri_PI

Espécie 4 (support = 0.600)

LCBL_23_Bcoccidentalis,IBSP_83333_Bcoccidentalis,LCBL_21_Bcoccidentalis,EU273651_Bcoccidentalis_Argentina,GQ300916_Bcoccidentalis_Argentina

Espécie 5 (support = 1.000)
MNRJ_24860_Bconstrictor_NovaIguacu_RJ

Espécie 6 (support = 0.263)

EU273628_Bcconstrictor_Iquitos_Loreto_Peru,KX150374_Bconstrictor_Venezuela,MNRJ_Bconstrictor_Falcon_Venezuela,EU273629_Bccontrictor_Guiana,EU273630_Bcconstrictor_Surname,EU273635_Bcconstrictor_Tarapoto_SanMartin_Peru,KJ621415_Bconstrictor_Nova_Brasilia_RO,MPEG_24581_Bconstrictor_Belem_PA,EU273654_Bcconstrictor_IlhadeMarajo_PA_Brasil,BM_326_VitoriadoXingu_PA,MPEG_21584_Bconstrictor_Melgaco_PA,MIGUEL_5677_Bconstrictor_PortoTrombetas_PA,QCZAR_6476_Bconstrictor_Orellana_Equador,HJ_0203_Bconstrictor_UHEJirau_RO,GQ300902_Bcconstrictor_Iquitos_Loreto_Peru,MTR_19406_Bconstrictor_Aruma_AM,MTR_18710_Bconstrictor_LagoChaviana_AM

Espécie 7 (support = 1.000)
KJ621530_Bconstrictor_CayosCochinoPequeno_Honduras

Espécie 8 (support = 1.000)
KJ621527_Bconstrictor_CanalZone_Panama

Espécie 9 (support = 1.000)
KJ621537_Bconstrictor_RioTortuguero_Limon_CostaRica

Espécie 10 (support = 1.000)
KJ621529_Bconstrictor_Paraiso_Panama

Espécie 11 (support = 1.000)
KJ621528_Bconstrictor_BarroColorado_Panama

Espécie 12 (support = 0.503)

KF576739_Bcortonii,QCZAR_5636_Bconstrictor_ElMango_Equador,CORBIDI_3790_Bcortonii

_Tumbes_Peru,KJ621452_Bconstrictor_SanJuandelosCues_Oxaca_Mexico,KJ621453_Bconstrictor_SanAgustinLoxicha_Oxaca_Mexico,KJ621461_Bconstrictor_SantiagoJamiltepec_Oxaca_Mexico,KJ621454_Bconstrictor_Tlachicon_Oxaca_Mexico

Espécie 13 (support = 1.000)
GQ300896_Bcconstrictor_Guiana

Espécie 14 (support = 1.000)
KJ621531_Bconstrictor_IsladeRoatan_Honduras

Espécie 15 (support = 0.690)

KX150413_Bconstrictor_Malacaton_SanMarcos_Guatemala,KJ621525_Bconstrictor_Antigua_Guatemala,KJ621535_Bconstrictor_Aranbala_Morazan_ElSalvador

Espécie 16 (support = 1.000)
CHUNB_49612_Bconstrictor_Brasilia_DF

Espécie 17 (support = 1.000)
KJ621534_Bconstrictor_SanFranciscoMenendez_Ahuachapan_ElSalv

Espécie 18 (support = 1.000)
CTMZ_04373_Bconstrictor_Brotas_SP

Espécie 19 (support = 1.000)
KJ621417_Bconstrictor_Beldiraguato_Sinaola_Mexico

Espécie 20 (support = 1.000)
KJ621465_Bconstrictor_StoDomingoTehuantepec_Oxaca_Mexico

Espécie 21 (support = 0.998)
MPEG_24428_Bconstrictor_Juriti_PA

Espécie 22 (support = 0.999)
KJ621436_Bconstrictor_Apatzingan_Mixoacan_Mexico

Espécie 23 (support = 0.529)

ALT_256_Bconstrictor_AltaFloresta_MT,RVSS_33_Bconstrictor_NovaUbirata_MT,UFA_223_Bconstrictor_Paranaita_MT,CHUNB_53038_Bconstrictor_AltaFlorestadOeste_RO

Espécie 24 (support = 0.991)
KJ621435_Bconstrictor_Aquila_Mixoacan_Mexico

Espécie 25 (support = 0.696)

MPEG_22195_Bconstrictor_CanaadosCarajas_PA,ESTR_00015_Bcconstrictor_Carolina_MA,MRT_7189_Bconstrictor_Guarai_TO

Espécie 26 (support = 0.998)
KJ621464_Bconstrictor_ElCamaron_Oxaca_Mexico

Espécie 27 (support = 0.943)
KJ621518_Bconstrictor_FelipeCarrilhoPuerto_QuintanaRoo_Mexic

Espécie 28 (support = 0.487)

KX150381_Bconstrictor_BajaVerapaz_Guatemala,KX150375_Bconstrictor_CayosCochino_Belize,KX150377_Bconstrictor_CrawlCay_Belize,KJ621477_Bconstrictor_LosChimalapas_Veracruz_Mexico

Espécie 29 (support = 0.642)

KJ621444_Bconstrictor_Atoyac_Guerrero_Mexico,GQ300935_Bcimperator_Cancun_QuintanaRoo_Mexico,KX150428_Bconstrictor_Colima_Mexico

Espécie 30 (support = 0.724)
MTR_19522_Bconstrictor_ParnaSerraCipo_MG,MJJS_270_Bconstrictor_Parauna_GO

Espécie 31 (support = 0.587)

KJ621438_Bconstrictor_PlayaAzul_Mixoacan_Mexico,KJ621439_Bconstrictor_Coalcoman_Mixoacan_Mexico,KJ621442_Bconstrictor_Ayutla_Guerrero_Mexico,KJ621459_Bconstrictor_PinotepaNacional_Oxaca_Mexico

Espécie 32 (support = 0.296)

KJ621510_Bconstrictor_Merida_Yucatan_Mexico,KJ621509_Bconstrictor_Piste_Yucatan_Mexico,KJ621519_Bconstrictor_ElTriunfo_Chiapas_Mexico,KJ621494_Bconstrictor_CiudaddelCarmen_Campeche_Mexico,KJ621520_Bconstrictor_Antigua_Guatemala,KJ621490_Bconstrictor_Centla_Tabasco_Mexico,KX150385_Bconstrictor_LagoonCay_Belize,KX150399_Bconstrictor_Honduras,KJ621507_Bconstrictor_Cuxtal_Yucatan_Mexico,EU273616_Bcimperator_Cancun_QuintanaRoo_Mexico

Espécie 33 (support = 0.693)

EU273619_Bcimperator_TuxtladeGutieerrez_Chiapas_Mexico,KX150378_Bconstrictor_Huehuetenango_Guatemala

Espécie 34 (support = 0.271)

KJ621478_Bconstrictor_BocadelRio_Veracruz_Mexico,KJ621474_Bconstrictor_BarradelTordo_Tamulipas_Mexico,EU273618_Bcimperator_Utila_Honduras,KJ621467_Bconstrictor_SierraMazateca_Oxaca_Mexico,KJ621468_Bconstrictor_TeotitlandelCamino_Oxaca_Mexico,KJ621473_Bconstrictor_ElCielo_Tamulipas_Mexico

Espécie 35 (support = 0.695)
KJ621475_Bconstrictor_EjidolaConcepcion_SanLuisPotosi_Mexico

Espécie 36 (support = 0.739)
LCBL_20_Bconstrictor_Xambioa_TO

Espécie 37 (support = 0.786)
MTR_7659_Bcamarali_Babaculandia_TO,MBIB_4038_Bcconstrictor_Teresina_PI

Espécie 38 (support = 0.704)
IBSP_79031_Bcconstrictor_Salvador_BA,IBSP_84445_Bconstrictor_Niquelandia_GO

Espécie 39 (support = 0.415)

CHBEZ_1254_Bconstrictor_SerraNegraNorte_RN,CHBEZ_1196_Bconstrictor_Caico_RN,MTR_20065_Bconstrictor_Mucuge_BA

Espécie 40 (support = 0.407)
CHBEZ_42_Bconstrictor_RioLargo_AL

Espécie 41 (support = 0.242)

IBSP_79063_Bcconstrictor_CachoeiroItapemirim_ES,MNRJ_22936_Bconstrictor_CaboFrio_RJ

,LCBL_17_Bconstrictor_Piracicaba_SP,MNRJ_20700_Bconstrictor_Teresopolis_RJ,MNRJ_19564_Bconstrictor_RiodeJaneiro_RJ

Espécie 42 (support = 0.481)
HM348868_Corallus_hortulanus

Espécie 43 (support = 0.331)
AY099986_Charina_bottae,HQ399501_Epicrates_cenchria,U69808_Eunectes_murinus

Espécie 44 (support = 0.806)
KJ621526_Bconstrictor_BocasdelToro_Panama

Espécie 45 (support = 0.324)

KX150409_Bconstrictor_CostaRica,KX150410_Bconstrictor_HoggIsland_Honduras,EU273665_Bcsabogae_SabogaIsland_Panama,EU273612_Bclongicauda,KX150403_Bconstrictor_ElSalvador,KX150402_Bconstrictor_Nicaragua

Espécie 46 (support = 0.660)

CTMZ_06126_Bconstrictor_Itauba_MT,CHUNB_22028_Bconstrictor_GuajaraMirim_RO,FIT_5_Bconstrictor_Santarem_PA

Espécie 47 (support = 0.331)

KJ621416_Bconstrictor_Alamos_Sonora_Mexico,KJ621426_Bconstrictor_PuertoVallarta_Jalisco_Mexico,KX150417_Bconstrictor_Sonora_Mexico,KJ621419_Bconstrictor_Acaponeta_Sinaola_Mexico,KJ621422_Bconstrictor_Manzanillo_Colima_Mexico,KJ621420_Bconstrictor_ElNaranjo_Colima_Mexico,KJ621432_Bconstrictor_LaHuerta_Jalisco_Mexico,KJ621431_Bconstrictor_Mascota_Jalisco_Mexico,KJ621433_Bconstrictor_ElLimon_Jalisco_Mexico

Espécie 48 (support = 0.587)
KJ621470_Bconstrictor_Huautla_Morelos_Mexico

Espécie 49 (support = 0.890)
MNRJ_16818_Bconstrictor_PortoTrombetas_PA

Espécie 50 (support = 0.495)
IBSP_79064_Bcamarali_Esmeraldas_MG

Espécie 51 (support = 0.265)

IBSP_84595_Bcamarali_Itu_SP,IBSP_84579_Bcamarali_FortalezadeMinas_MG,IBSP_84578_Bcamarali_Cabreuva_SP,CTMZ_00603_Bconstrictor_Paulinia_SP,IBSP_84577_Bcamarali_Guarulhos_SP

Espécie 52 (support = 0.142)
KJ621523_Bconstrictor_ElRosario_Zacapa_Guatemala

Espécie 53 (support = 0.142)
KJ621524_Bconstrictor_Escuintla_Izabal_Guatemala

Espécie 54 (support = 0.315)

LCBL_2_Bconstrictor_SenadorGuiomard_AC,LCBL_1_Bconstrictor_RioBranco_AC,HJ_0547Bconstrictor_MutumParana_RO,H_1293_Bconstrictor_PortoVelho_RO,LCBL_8_Bconstrictor_SaoCarlos_SP,IBSP_84580_Bcamarali_Sacramento_MG,CTMZ_05754_Bconstrictor_Guiratinga_MT

Espécie 55 (support = 0.717)

LCBL_12_Bconstrictor_Manaus_AM

Espécie 56 (support = 0.449)
BM_90_Bconstrictor_UHEBeloMonte_PA

Espécie 57 (support = 0.307)

MRT_4377_Bconstrictor_Parana_TO,MNRJ_20989_Bconstrictor_Corumba_MS,CTMZ_06043_Bconstrictor_BarradoGarcas_MT

ANEXO 8 - Matriz: Cytb, Árvore de entrada: IB

Espécie 1 (support = 1.000)
AY099986_Charina_bottae

Espécie 2 (support = 1.000)
U69808_Eunectes_murinus

Espécie 3 (support = 1.000)
HQ399501_Epicrates_cenchria

Espécie 4 (support = 1.000)
HM348868_Corallus_hortulanus

Espécie 5 (support = 1.000)
CHUNB_61848_Bconstrictor_Piripiri_PI

Espécie 6 (support = 0.786)
KF576734_Bcorophias,KF576731_Bcnebulosa

Espécie 7 (support = 1.000)
KJ621530_Bconstrictor_CayosCochinoPequeno_Honduras

Espécie 8 (support = 0.375)

IBSP_83333_Bcoccidentalis,LCBL_21_Bcoccidentalis,LCBL_23_Bcoccidentalis,EU273651_Bcoccidentalis_Argentina,GQ300916_Bcoccidentalis_Argentina

Espécie 9 (support = 1.000)
KJ621529_Bconstrictor_Paraiso_Panama

Espécie 10 (support = 0.531)

KJ621452_Bconstrictor_SanJuandelosCues_Oxaca_Mexico,KJ621453_Bconstrictor_SanAgustinLoxicha_Oxaca_Mexico,KJ621461_Bconstrictor_SantiagoJamiltepec_Oxaca_Mexico,KJ621454_Bconstrictor_Tlachicon_Oxaca_Mexico,CORBIDI_3790_Bclongicauda_Tumbes_Peru,QCZAR_5636_Bconstrictor_ElMango_Equador,KF576739_Bcortonii

Espécie 11 (support = 1.000)
KJ621531_Bconstrictor_IsladeRoatan_Honduras

Espécie 12 (support = 1.000)
KJ621534_Bconstrictor_SanFranciscoMenendez_Ahuachapan_ElSalvador

Espécie 13 (support = 1.000)
KJ621507_Bconstrictor_Cuxtal_Yucatan_Mexico

Espécie 14 (support = 1.000)
EU273616_Bcimperator_Cancun_QuintanaRoo_Mexico

Espécie 15 (support = 1.000)
KX150399_Bconstrictor_Honduras

Espécie 16 (support = 1.000)
KX150385_Bconstrictor_LagoonCay_Belize

Espécie 17 (support = 0.623)

KX150375_Bconstrictor_CayosCochino_Belize,KX150377_Bconstrictor_CrawlCay_Belize,KX150381_Bconstrictor_BajaVerapaz_Guatemala

Espécie 18 (support = 1.000)
KJ621537_Bconstrictor_RioTortuguero_Limon_CostaRica

Espécie 19 (support = 1.000)
KJ621527_Bconstrictor_CanalZone_Panama

Espécie 20 (support = 1.000)
GQ300896_Bcconstrictor_Guiana

Espécie 21 (support = 1.000)
KJ621477_Bconstrictor_LosChimalapas_Veracruz_Mexico

Espécie 22 (support = 0.795)

KJ621523_Bconstrictor_ElRosario_Zacapa_Guatemala,KJ621524_Bconstrictor_Escuintla_Izabal_Guatemala

Espécie 23 (support = 1.000)
KJ621526_Bconstrictor_BocasdelToro_Panama

Espécie 24 (support = 0.998)
KJ621464_Bconstrictor_ElCamaron_Oxaca_Mexico

Espécie 25 (support = 1.000)
KJ621528_Bconstrictor_BarroColorado_Panama

Espécie 26 (support = 0.998)
CTMZ_04373_Bconstrictor_Brotas_SP

Espécie 27 (support = 0.991)
KJ621475_Bconstrictor_EjidolaConcepcion_SanLuisPotosi_Mexico

Espécie 28 (support = 0.984)
KJ621417_Bconstrictor_Beldiraguato_Sinaola_Mexico

Espécie 29 (support = 0.476)

CTMZ_00603_Bconstrictor_Paulinia_SP,IBSP_84577_Bcamarali_Guarulhos_SP,IBSP_84578_Bcamarali_Cabreuva_SP,IBSP_84579_Bcamarali_FortalezadeMinas_MG,IBSP_84595_Bcamarali_Itu_SP,IBSP_79064_Bcamarali_Esmeraldas_MG

Espécie 30 (support = 0.950)
CTMZ_06043_Bconstrictor_BarradoGarcas_MT

Espécie 31 (support = 0.996)
KJ621535_Bconstrictor_Aranbala_Morazan_ElSalvador

Espécie 32 (support = 0.782)

KX150413_Bconstrictor_Malacaton_SanMarcos_Guatemala,KJ621525_Bconstrictor_Antigua_Guatemala

Espécie 33 (support = 0.297)

KX150428_Bconstrictor_Colima_Mexico,GQ300935_Bcimperator_Cancun_QuintanaRoo_Mexico,KJ621444_Bconstrictor_Atoyac_Guerrero_Mexico,KJ621438_Bconstrictor_PlayaAzul_Mixoacan_Mexico,KJ621439_Bconstrictor_Coalcoman_Mixoacan_Mexico,KJ621442_Bconstrictor_Ayutla_Guerrero_Mexico,KJ621459_Bconstrictor_PinotepaNacional_Oxaca_Mexico,KJ621435_Bconstrictor_Aquila_Mixoacan_Mexico,KJ621436_Bconstrictor_Apatzingan_Mixoacan_Mexico

Espécie 34 (support = 0.579)

ALT_256_Bconstrictor_AltaFloresta_MT,RVSS_33_Bconstrictor_NovaUbirata_MT,UFA_223_Bconstrictor_Paranaita_MT

Espécie 35 (support = 0.919)
CHUNB_22028_Bconstrictor_GuajaraMirim_RO

Espécie 36 (support = 0.874)
FIT_5_Bconstrictor_Santarem_PA

Espécie 37 (support = 0.808)
CTMZ_06126_Bconstrictor_Itauba_MT

Espécie 38 (support = 0.970)
KJ621518_Bconstrictor_FelipeCarrilhoPuerto_QuintanaRoo_Mexico

Espécie 39 (support = 0.639)
EU273618_Bcimperator_Utila_Honduras

Espécie 40 (support = 0.262)

KJ621473_Bconstrictor_ElCielo_Tamulipas_Mexico,KJ621468_Bconstrictor_TeotitlandelCamino_Oxaca_Mexico

Espécie 41 (support = 0.908)
MNRJ_20989_Bconstrictor_Corumba_MS

Espécie 42 (support = 0.857)
MPEG_24428_Bconstrictor_Juriti_PA

Espécie 43 (support = 0.857)
CHUNB_49612_Bconstrictor_Brasilia_DF

Espécie 44 (support = 0.856)
MRT_4377_Bconstrictor_Parana_TO

Espécie 45 (support = 0.281)

KX150417_Bconstrictor_Sonora_Mexico,KJ621416_Bconstrictor_Alamos_Sonora_Mexico,KJ621426_Bconstrictor_PuertoVallarta_Jalisco_Mexico,KJ621419_Bconstrictor_Acaponeta_Sinaola_Mexico,KJ621420_Bconstrictor_ElNaranjo_Colima_Mexico,KJ621422_Bconstrictor_Manzanillo_Colima_Mexico,KJ621431_Bconstrictor_Mascota_Jalisco_Mexico,KJ621432_Bconstrictor_LaHuerta_Jalisco_Mexico,KJ621433_Bconstrictor_ElLimon_Jalisco_Mexico

Espécie 46 (support = 0.746)
KJ621470_Bconstrictor_Huautla_Morelos_Mexico

Espécie 47 (support = 0.412)

KX150374_Bconstrictor_Venezuela,MNRJ_Bconstrictor_Falcon_Venezuela,EU273629_Bcconstrictor_Guiana,EU273630_Bcconstrictor_Suriname

Espécie 48 (support = 0.155)

LCBL_1_Bconstrictor_RioBranco_AC,LCBL_2_Bconstrictor_SenadorGuiomard_AC,H_1293_Bconstrictor_PortoVelho_RO,HJ_0547Bconstrictor_MutumParana_RO,LCBL_12_Bconstrictor_Manaus_AM

Espécie 49 (support = 0.429)
EU273635_Bcconstrictor_Tarapoto_SanMartin_Peru

Espécie 50 (support = 0.429)
EU273628_Bcconstrictor_Iquitos_Loreto_Peru

Espécie 51 (support = 0.780)
BM_90_Bconstrictor_UHEBeloMonte_PA

Espécie 52 (support = 0.672)
MTR_19522_Bconstrictor_ParnaSerraCipo_MG

Espécie 53 (support = 0.897)
KJ621465_Bconstrictor_StoDomingoTehuantepec_Oxaca_Mexico

Espécie 54 (support = 0.707)

KX150378_Bconstrictor_Huehuetenango_Guatemala,EU273619_Bcimperator_TuxtladeGutieerrez_Chiapas_Mexico

Espécie 55 (support = 0.549)

KJ621509_Bconstrictor_Piste_Yucatan_Mexico,KJ621510_Bconstrictor_Merida_Yucatan_Mexico

Espécie 56 (support = 0.497)
MNRJ_16818_Bconstrictor_PortoTrombetas_PA

Espécie 57 (support = 0.497)
CHUNB_53038_Bconstrictor_AltaFlorestadOeste_RO

Espécie 58 (support = 0.877)
MNRJ_24860_Bconstrictor_NovaIguacu_RJ

Espécie 59 (support = 0.449)
MIGUEL_5677_Bconstrictor_PortoTrombetas_PA

Espécie 60 (support = 0.219)
MBIB_4038_Bcconstrictor_Teresina_PI,MTR_7659_Bcamarali_Babaculandia_TO

Espécie 61 (support = 0.232)

CHBEZ_1196_Bconstrictor_Caico_RN,CHBEZ_1254_Bconstrictor_SerraNegraNorte_RN,CHBEZ_42_Bconstrictor_RioLargo_AL,IBSP_79031_Bcconstrictor_Salvador_BA,IBSP_84445_Bconstrictor_Niquelandia_GO,MTR_20065_Bconstrictor_Mucuge_BA,IBSP_79063_Bcconstrictor_CachoeiroItapemirim_ES,LCBL_17_Bconstrictor_Piracicaba_SP,MNRJ_19564_Bconstrictor_RiodeJaneiro_RJ,MNRJ_20700_Bconstrictor_Teresopolis_RJ,MNRJ_22936_Bconstrictor_CaboFrio_RJ

Espécie 62 (support = 0.167)

HJ_0203_Bconstrictor_UHEJirau_RO,GQ300902_Bcconstrictor_Iquitos_Loreto_Peru,QCZAR_6476_Bconstrictor_Orellana_Equador

Espécie 63 (support = 0.095)

KJ621478_Bconstrictor_BocadelRio_Veracruz_Mexico,KJ621474_Bconstrictor_BarradelTordo_Tamulipas_Mexico

Espécie 64 (support = 0.126)
KJ621467_Bconstrictor_SierraMazateca_Oxaca_Mexico

Espécie 65 (support = 0.421)

KX150402_Bconstrictor_Nicaragua,KX150403_Bconstrictor_ElSalvador,EU273612_Bclongicauda

Espécie 66 (support = 0.319)

ESTR_00015_Bcconstrictor_Carolina_MA,MPEG_22195_Bconstrictor_CanaadosCarajas_PA,MRT_7189_Bconstrictor_Guarai_TO

Espécie 67 (support = 0.358)
LCBL_20_Bconstrictor_Xambioa_TO

Espécie 68 (support = 0.358)
MJJS_270_Bconstrictor_Parauna_GO

Espécie 69 (support = 0.214)
CTMZ_05754_Bconstrictor_Guiratinga_MT

Espécie 70 (support = 0.384)
KJ621519_Bconstrictor_ElTriunfo_Chiapas_Mexico

Espécie 71 (support = 0.237)

KJ621494_Bconstrictor_CiudaddelCarmen_Campeche_Mexico,KJ621520_Bconstrictor_Antigua_Guatemala,KJ621490_Bconstrictor_Centla_Tabasco_Mexico

Espécie 72 (support = 0.340)
KX150409_Bconstrictor_CostaRica,KX150410_Bconstrictor_HoggIsland_Honduras

Espécie 73 (support = 0.449)
EU273665_Bcsabogae_SabogaIsland_Panama

Espécie 74 (support = 0.051)
LCBL_8_Bconstrictor_SaoCarlos_SP

Espécie 75 (support = 0.051)
IBSP_84580_Bcamarali_Sacramento_MG

Espécie 76 (support = 0.237)

MPEG_21584_Bconstrictor_Melgaco_PA,EU273654_Bcconstrictor_IlhadeMarajo_PA_Brasil,MPEG_24581_Bconstrictor_Belem_PA,KJ621415_Bconstrictor_Nova_Brasilia_RO

Espécie 77 (support = 0.419)
BM_326_VitoriadoXingu_PA

Espécie 78 (support = 0.129)
MTR_18710_Bconstrictor_LagoChaviana_AM

Espécie 79 (support = 0.129) MTR_19406_Bconstrictor_Aruma_AM

ANEXO 9 - Matriz: 4Genes, Árvore de entrada: MV

Espécie 1 (support = 1.000)
AY099986_Charina_bottae

Espécie 2 (support = 1.000)
U69808_Eunectes_murinus

Espécie 3 (support = 1.000)
HQ399501_Epicrates_cenchria

Espécie 4 (support = 1.000)
HM348868_Corallus_hortulanus

Espécie 5 (support = 1.000)
CORBIDI_3790_Bcortonii_Tumbes_Peru

Espécie 6 (support = 0.667)

MPEG_24581_Bconstrictor_Belem_PA,FIT_8_Bconstrictor_Santarem_PA,MPEG_21584_Bconstrictor_Melgaco_PA,IBSP_79522_Bconstrictor_Piripiri_PI,LCBL_13_Bconstrictor_Manaus_AM,MTR_19406_Bconstrictor_Aruma_AM,HJ_0203_Bconstrictor_UHEJirau_RO

Espécie 7 (support = 0.780)
IBSP_83333_Bcoccidentalis,LCBL_21_Bcoccidentalis,LCBL_23_Bcoccidentalis

Espécie 8 (support = 0.440)

MBIB_4038_Bcconstrictor_Teresina_PI,MTR_7659_Bcamarali_Babaculandia_TO,CHBEZ_42_Bconstrictor_RioLargo_AL,IBSP_79031_Bcconstrictor_Salvador_BA,CHBEZ_1196_Bconstrictor_Caico_RN,CHBEZ_1254_Bconstrictor_SerraNegraNorte_RN,MNRJ_22936_Bconstrictor_CaboFrio_RJ,MNRJ_19740_Bconstrictor_RiodeJaneiro_RJ,IBSP_79063_Bcconstrictor_CachoeiroItapemirim_ES,MTR_20065_Bconstrictor_Mucuge_BA

Espécie 9 (support = 0.875)
IBSP_84580_Bcamarali_Sacramento_MG,CTMZ_05754_Bconstrictor_Guiratinga_MT

Espécie 10 (support = 1.000)
MPEG_24428_Bconstrictor_Juriti_PA

Espécie 11 (support = 0.887)
LCBL_1_Bconstrictor_RioBranco_AC,LCBL_2_Bconstrictor_SenadorGuiomard_AC

Espécie 12 (support = 1.000)
CHUNB_22028_Bconstrictor_GuajaraMirim_RO

Espécie 13 (support = 0.868)
CTMZ_06126_Bconstrictor_Itauba_MT,CHUNB_49612_Bconstrictor_Brasilia_DF

Espécie 14 (support = 0.772)

UFA_223_Bconstrictor_Paranaita_MT,MNRJ_16818_Bconstrictor_PortoTrombetas_PA,RVSS_33_Bconstrictor_NovaUbirata_MT

Espécie 15 (support = 0.997)
H_1293_Bconstrictor_PortoVelho_RO

Espécie 16 (support = 0.855)
LCBL_20_Bconstrictor_Xambioa_TO,BM_90_Bconstrictor_UHEBeloMonte_PA

Espécie 17 (support = 0.915)
MNRJ_20989_Bconstrictor_Corumba_MS

Espécie 18 (support = 0.579)
CHUNB_44537_Bconstrictor_Buritizeiro_MG,LCBL_15_Bconstrictor_Piracicaba_SP

Espécie 19 (support = 0.385)

MTR_19522_Bconstrictor_ParnaSerraCipo_MG,IBSP_79064_Bcamarali_Esmeraldas_MG,IBSP_84579_Bcamarali_FortalezadeMinas_MG,CTMZ_06043_Bconstrictor_BarradoGarca_MT,IBSP_84578_Bcamarali_Cabreuva_SP,MPEG_22195_Bconstrictor_CanaadosCarajas_PA,MRT_7189_Bconstrictor_Guarai_TO,MRT_4377_Bconstrictor_Parana_TO,CTMZ_00603_Bconstrictor_Paulinia_SP,CTMZ_04373_Bconstrictor_Brotas_SP,IBSP_84577_Bcamarali_Guarulhos_SP,IBSP_84595_Bcamarali_Itu_SP

ANEXO 10 - Matriz: 4Genes, Árvore de entrada: IB

Espécie 1 (support = 1.000)
AY099986_Charina_bottae

Espécie 2 (support = 1.000)
U69808_Eunectes_murinus

Espécie 3 (support = 1.000)
HQ399501_Epicrates_cenchria

Espécie 4 (support = 1.000)
HM348868_Corallus_hortulanus

Espécie 5 (support = 1.000)
CORBIDI_3790_Bcortonii_Tumbes_Peru

Espécie 6 (support = 1.000)
CHUNB_22028_Bconstrictor_GuajaraMirim_RO

Espécie 7 (support = 0.990)
CTMZ_06126_Bconstrictor_Itauba_MT

Espécie 8 (support = 0.975)
UFA_223_Bconstrictor_Paranaita_MT

Espécie 9 (support = 0.913)
CTMZ_04373_Bconstrictor_Brotas_SP

Espécie 10 (support = 0.944)
MPEG_24428_Bconstrictor_Juriti_PA

Espécie 11 (support = 0.883)
MNRJ_16818_Bconstrictor_PortoTrombetas_PA

Espécie 12 (support = 0.660)
RVSS_33_Bconstrictor_NovaUbirata_MT,CHUNB_49612_Bconstrictor_Brasilia_DF

Espécie 13 (support = 0.715)
CTMZ_05754_Bconstrictor_Guiratinga_MT,IBSP_84580_Bcamarali_Sacramento_MG

Espécie 14 (support = 0.966)
LCBL_1_Bconstrictor_RioBranco_AC

Espécie 15 (support = 0.919)
LCBL_2_Bconstrictor_SenadorGuiomard_AC

Espécie 16 (support = 0.919)
H_1293_Bconstrictor_PortoVelho_RO

Espécie 17 (support = 0.462)

CHUNB_44537_Bconstrictor_Buritizeiro_MG,IBSP_79064_Bcamarali_Esmeraldas_MG,MTR_19522_Bconstrictor_ParnaSerraCipo_MG

Espécie 18 (support = 0.968)
CTMZ_06043_Bconstrictor_BarradoGarca_MT

Espécie 19 (support = 0.931)
IBSP_84578_Bcamarali_Cabreuva_SP

Espécie 20 (support = 0.316)

FIT_8_Bconstrictor_Santarem_PA,MPEG_21584_Bconstrictor_Melgaco_PA,MPEG_24581_Bconstrictor_Belem_PA,IBSP_79522_Bconstrictor_Piripiri_PI,HJ_0203_Bconstrictor_UHEJirau_RO,LCBL_13_Bconstrictor_Manaus_AM,MTR_19406_Bconstrictor_Aruma_AM

Espécie 21 (support = 0.868)
BM_90_Bconstrictor_UHEBeloMonte_PA

Espécie 22 (support = 0.868)
LCBL_20_Bconstrictor_Xambioa_TO

Espécie 23 (support = 0.876)
IBSP_84579_Bcamarali_FortalezadeMinas_MG

Espécie 24 (support = 0.782)
MNRJ_20989_Bconstrictor_Corumba_MS

Espécie 25 (support = 0.466)
MRT_4377_Bconstrictor_Parana_TO,MRT_7189_Bconstrictor_Guarai_TO

Espécie 26 (support = 0.627)
MPEG_22195_Bconstrictor_CanaadosCarajas_PA

Espécie 27 (support = 0.472)
IBSP_83333_Bcoccidentalis,LCBL_21_Bcoccidentalis,LCBL_23_Bcoccidentalis

Espécie 28 (support = 0.563)
CHBEZ_1196_Bconstrictor_Caico_RN,CHBEZ_1254_Bconstrictor_SerraNegraNorte_RN

Espécie 29 (support = 0.326)

MTR_20065_Bconstrictor_Mucuge_BA,IBSP_79063_Bcconstrictor_CachoeiroItapemirim_ES,MNRJ_19740_Bconstrictor_RiodeJaneiro_RJ,MNRJ_22936_Bconstrictor_CaboFrio_RJ

Espécie 30 (support = 0.384)
MBIB_4038_Bcconstrictor_Teresina_PI,MTR_7659_Bcamarali_Babaculandia_TO

Espécie 31 (support = 0.706)
CTMZ_00603_Bconstrictor_Paulinia_SP

Espécie 32 (support = 0.576)
IBSP_84577_Bcamarali_Guarulhos_SP

Espécie 33 (support = 0.354)
CHBEZ_42_Bconstrictor_RioLargo_AL

Espécie 34 (support = 0.354)
IBSP_79031_Bcconstrictor_Salvador_BA

Espécie 35 (support = 0.401)
IBSP_84595_Bcamarali_Itu_SP

Espécie 36 (support = 0.401)
LCBL_15_Bconstrictor_Piracicaba_SP