



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL BRANDÃO DE MELLO NETTO

**REVISÃO SISTEMÁTICA DAS TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM CROCODILIANOS**

RECIFE
2025

GABRIEL BRANDÃO DE MELLO NETTO

REVISÃO SISTEMÁTICA DAS TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM CROCODILIANOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Coorientadora: Prof. Dra. Jozélia Maria de Sousa Correia

RECIFE

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Lorena Teles – CRB-4 1774

N472r

Netto, Gabriel Brandão de Mello.

Revisão sistemática das técnicas moleculares utilizadas para análise da diversidade genética em crocodilianos / Gabriel Brandão de Mello Netto. – Recife, 2025.

72 f.; il.

Orientador(a): Paulo Roberto Eleutério de Souza.

Co-orientador(a): Jozélia Maria de Sousa Correia.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2025.

Inclui referências.

1. Crocodilos - Genética - Métodos estatísticos. 2. Variação genética. 3. Biologia molecular. I. Souza, Paulo Roberto Eleutério de, orient. II. Correia, Jozélia Maria de Sousa, coorient. III. Título

CDD 574

GABRIEL BRANDÃO DE MELLO NETTO

REVISÃO SISTEMÁTICA DAS TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM CROCODILIANOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Rural de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Profa. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Igor Joventino Roberto (Examinador Externo)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dr. Rafael Sá Leitão Barboza (Suplente)
Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA

Dedico essa monografia com muito amor e alegria à minha mãe Heliana, minha inspiração, exemplo de ser humano, ao meu pai Salvador, meu eterno guerreiro, meu melhor amigo. À minha irmã, Cacau. Aos meus avós, Maria do Carmo, Virgílio e Ana Maria. Aos meus padrinhos Marcelo e Adriana. À minha tia Ana Beatriz. Aos meus primos. A todos meus amigos, e não menos importante, a todos meus companheiros e amigos que pude conhecer graças ao Laboratório Interdisciplinar de Anfíbios e Répteis (LIAR) e a UFRPE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente e primeiramente a Deus, por tudo que passei e aprendi nessa etapa. Agradeço a tudo que foi e é ensinado pelo meu pai mesmo não estando mais fisicamente presente, meu eterno campeão, te amo muito e sinto muito sua falta, agradeço a minha mãe por todo apoio, suporte, nos momentos em que tive dúvida e estava perdido, você sempre soube me amparar e ajudar a me reencontrar, todas as broncas e ensinamentos que você continua me passar, te amo muito “mãebidiqui”, espero que esse passo dado possa deixar vocês um pouco orgulhosos. Agradeço a toda minha família pelo suporte de sempre e preocupação nas horas difíceis, sem vocês isso não seria possível. Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e me aguentando, em especial aquelas amizades que pude fazer no decorrer do curso e quando entrei no lab, obrigado por tudo, amo todos. Gabi, Lucas, Iza, Galhega, Fran, foram muitos perrengues e alegrias juntos, agonias e alívios, dúvidas e certezas, sem vocês nessa jornada, nada teria sido tão especial como foi, amo cada um de vocês e agradeço por estarem comigo nessa caminhada. Grupo “campers” que possamos evoluir cada vez mais nessa área que amamos, obrigado por tudo, amo vocês.

Obrigado a UFRPE, por ter proporcionado um curso de graduação de excelência com professores incríveis onde pude aprender muito, e poder me encontrar na linda diversidade da biologia.

Um agradecimento em especial para a “Profa” Jozélia, por me dar a oportunidade de entrar no L.I.A.R., me apaixonei ainda mais pela herpeto e principalmente pelos crocs, essa oportunidade me fez crescer muito como ser humano e pesquisador, sou muito grato a senhora, de coração, obrigado por ser uma de minhas referências na área e inspiração, e principalmente obrigado por ter confiado em mim. Obrigado a Haggy, Rafa, Paulo, Carlos pela amizade construída e ensinamentos passados, vocês são inspiração e referência de profissionais. Não menos importante, agradeço ao meu Orientador Paulo Eleutério, por toda ajuda e orientação na condução dessa monografia e de todo conhecimento transmitido, aprendi muito com o senhor e sou muito grato a isso.

RESUMO

Os crocodilianos são animais de importância para o equilíbrio ecossistêmico, desempenhando diversos papéis chave nos ambientes aquáticos. Esse grupo enfrenta ameaças devido à perda de habitat e fragmentação, levando ao isolamento de suas populações e diminuição do fluxo gênico, aumentando o risco de extinção das espécies. Logo, estudos de diversidade genética em crocodilianos são essenciais para a compreensão de sua estrutura populacional, fluxo gênico e adaptação a ambientes em mudança, proporcionando estratégias de conservação e manejo. Com esse intuito, o presente estudo realizou uma revisão sistemática para elencar os métodos moleculares usados na avaliação da diversidade genética em crocodilianos. As plataformas utilizadas na pesquisa foram: PubMed, SciELO, Capes e newsletter do Crocodile Specialist Group (CSG). De cada documento foram extraídos: tipo de publicação, país de origem das amostras estudadas, espécies alvo do estudo, tipo de amostra biológica, método de extração de DNA e o método usado para avaliar a detecção da diversidade genética molecular. A série temporal das publicações ocorreu entre os anos de 1994 e 2024. Foram selecionadas 139 publicações, incluindo: cinco dissertações de mestrado (3,6%), duas teses de doutorado (1,4%), duas publicações do newsletter CSG (1,4%) e 130 artigos científicos (93,5%). Os tipos de amostras (n=12) mais utilizados nas publicações foram sangue (32,4%) e escama (30,9%), por ser um método menos invasivo e pela facilidade de obtenção. As amostras foram procedentes de 59 países, com destaque para Brasil, 19 publicações, China (n= 18) e Estados Unidos (n= 17). Foram alvos dos estudos, 25 espécies de crocodilianos, com destaque para *Crocodylus acutus* (n= 30), *Crocodylus porosus* (n= 19) e *Crocodylus moreletii* (n=18). Além disso, foram elencados os dez métodos de extração de DNA mais frequentes, com seus princípios e tipo de amostra, destacando-se o Protocolo Sambrook *et al.* (1989) (n=21) e o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) (n=17). Os métodos moleculares utilizados a base de sequenciamento foram: sequenciamento Sanger ou NGS e sequenciamento ddRAD-seq/DARTseq/sRAD-seq, sendo o sequenciamento Sanger ou NGS o mais utilizado nos estudos, (n=79; 56,8%). Entre os métodos a base de sequenciamento o marcador molecular mais utilizado foi o CytB, (n=36; 40,4%), seguido de COI (n=22; 24,7%) e microssatélites (n=18; 20,2%). Já os métodos utilizados a base de PCR foram: PCR, ISSR-PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR e AFLP-PCR, sendo PCR o segundo método mais utilizado, em 39 publicações (28,1%). O presente estudo de revisão mostrou que a combinação de técnicas moleculares se mostrou a melhor alternativa, pois aumenta a amplitude, eficiência e confiabilidade na detecção da variabilidade genética em crocodilianos.

Palavras-chave: Crocodylia, Variação Genética, Variabilidade Genética, Métodos Moleculares.

ABSTRACT

Crocodylians are animals of utmost importance for maintaining ecological balance, playing various key roles in aquatic environments. This group faces threats due to habitat loss and fragmentation, leading to the isolation of their populations and the reduction of gene flow, which increases the risk of species extinction. Therefore, genetic diversity studies in crocodylians are essential for understanding their population structure, gene flow, and adaptation to changing environments, providing conservation and management strategies. With this aim, the present study conducted a systematic review to identify the molecular methods used to assess genetic diversity in crocodylians. The research was conducted on the following platforms: PubMed, Scielo, Capes, and the Crocodile Specialist Group (CSG) newsletter. From each document, the following data were extracted: type of publication, country of origin of the studied samples, target species, biological sample type, DNA extraction method, and the molecular method used to evaluate genetic diversity. The publication period covered the years 1994 to 2024, with a total of 139 publications selected, including five master's dissertations (3.6%), two doctoral theses (1.4%), two publications from the CSG newsletter (1.4%), and 130 scientific articles (93.5%). The most frequently used biological samples (n=12) were blood (32.4%) and scales (30.9%), likely due to their minimally invasive nature and ease of collection. The most commonly used sample types (n=12) in the publications were blood (32.4%) and scales (30.9%), due to their less invasive nature and ease of collection. Samples originated from 59 countries, with Brazil (19 publications), China (18), and the United States (17) standing out. Twenty-five crocodylian species were the focus of the studies, with emphasis on *Crocodylus acutus* (30 studies), *Crocodylus porosus* (19 studies), and *Crocodylus moreletii* (18 studies). Furthermore, the ten most frequently used DNA extraction methods were identified, along with their principles and sample types, with notable mentions to the protocol by Sambrook et al. (1989), used 21 times, and the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), used 17 times. The molecular methods based on sequencing employed in the studies included Sanger sequencing or next-generation sequencing (NGS), as well as ddRAD-seq, DArTseq, and sRAD-seq. Among these, Sanger sequencing or NGS was the most frequently used, appearing in 79 studies (56.8%). Within sequencing-based approaches, the most commonly utilized molecular marker was CytB, reported in 36 publications (40.4%), followed by COI in 22 publications (24.7%) and microsatellites in 18 (20.2%). PCR-based techniques included conventional PCR, ISSR-PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR, and AFLP-PCR, with conventional PCR being the second most frequently applied method, used in 39 studies (28.1%). This systematic review indicates that the combined use of molecular techniques represents the most effective approach, as it enhances the scope, efficiency, and reliability of detecting genetic variability in crocodylians.

Keywords: *Crocodylia, Genetic Variation, Genetic Variability, Molecular Methods.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Quantidade de estudos publicados a cada 5 anos com objetivo de avaliar diversidade genética em crocodilianos. 37
- Figura 2** – Quantidade de estudos de diversidade genética representado por família de crocodilianos no período de 1994 a 2024. 38
- Figura 3** – Espécies de crocodilianos identificadas nos estudos de diversidade genética no período de 1994 a 2024. 39
- Figura 4** – Mapa global representando a quantidade e procedência das amostras de crocodilianos nos estudos sobre diversidade genética, no período de 1994 a 2024. 40
- Figura 5** – Tipos de amostras biológicas utilizadas por estudos de diversidade genética em crocodilianos avaliados no período de 1994 a 2024. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Metodologias de extração de DNA utilizadas nos estudos de diversidade genética, com os princípios de cada método, vantagem, desvantagem e as amostras utilizadas em cada protocolo, no período de 1994 a 2024.	42
Tabela 2 –	Os tipos de sequenciamento usados nos estudos, com os autores que utilizaram tal método e qual região do DNA foi avaliada marcadores moleculares utilizados	44
Tabela 3 –	Métodos de PCR, ISSR-PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR e AFLP-PCR, com os autores que utilizaram tal método e qual região do DNA foi avaliada, para cada método molecular.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo no comprimento de Fragmentos amplificados
CytB	Citocromo B
CTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeo
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo
ISSR	Repetição de sequências simples internas
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA Nuclear
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente
RADseq	Sítio de Restrição Associado ao Sequenciamento de DNA
RFLP	Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição
SNP	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
SSR	Repetições de Sequências Simples

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Importância da Diversidade Genética nos Crocodilianos	16
2.2	Métodos utilizados para Análise da Variabilidade Genética	16
2.2.1	Métodos a base de polymerase chain reaction (PCR)	17
2.2.1.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	17
2.2.1.2	Amplificação randômica de dna polimórfico (RAPD)	18
2.2.1.3	Polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados (AFLP)	19
2.2.1.4	PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	21
2.2.1.5	Repetição de sequências simples internas (ISSR)	22
2.2.2	Métodos a base de sequenciamento de DNA	24
2.2.2.1	Sequenciamento sanger	24
2.2.2.2	Sequenciamento de nova geração	25
2.2.2.2.1	RADseq (Restriction site Associated DNA sequencing)	26
2.3	Marcadores moleculares	28
2.3.1	Microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats)	28
2.3.2	Marcadores Mitocondriais	29
2.3.3	SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)	30
2.4	Variação Genética Intra e Interespecífica	31
2.5	Aplicações dos Estudos de Diversidade Genética na Conservação dos Crocodilianos	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	GERAL	34
3.2	ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Revisão Sistemática de Literatura	35
4.2	Levantamento e organização dos Dados	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Escala temporal da diversidade genética em crocodilianos	37
5.2	Espécies de crocodilianos em estudos de diversidade genética	38
5.3	Origem geográfica das amostras	40
5.4	Tipos de Amostras Biológicas	40
5.5	Métodos de extração de DNA	42
5.6	Métodos Moleculares para Avaliar a Diversidade Genética	44
6	DISCUSSÃO	47
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Os crocodilianos pertencem à ordem Crocodylia, um grupo de répteis ectotérmicos e semiaquáticos amplamente distribuídos pelo mundo. São animais longevos, que podem passar dos 60 anos de vida (GRIGG e KIRSHNER, 2015). Esses animais desempenham um papel ecológico fundamental nos ecossistemas aquáticos, atuando no controle de populações, influenciando diretamente a dinâmica das cadeias alimentares e o equilíbrio ambiental, além de seu papel fundamental como engenheiro de ecossistema, moldando o ambiente de inúmeras formas ao seu redor e induzindo a ciclagem de nutrientes (MAZZOTTI *et al.*, 2009; SOMAWEERA *et al.*, 2020; STRICKLAND *et al.*, 2023).

Segundo Somaweera *et al.* (2020) são animais que respondem de forma clara a mudanças no ambiente – como variações na reprodução, na condição corporal e na abundância – refletem transformações no ecossistema de maneira integrada, são relativamente fáceis de monitorar e frequentemente são prioritários em iniciativas de gestão e conservação. Mazzotti *et al.* (2009) descreveram os aligatores e crocodilos como indicadores de restauração ecossistêmica, e Dos Santos *et al.* (2021,2024) revelaram poder bioacumulativo de metais nesses animais, mostrando o poder bioindicativo desse grupo.

A diversidade genética dentro do grupo Crocodylia tem sido um campo de estudo de crescente interesse e com o avanço das técnicas moleculares, pesquisadores têm conseguido compreender melhor as variações genéticas entre diferentes populações e espécies, o que auxilia na identificação de linhagens distintas e na formulação de estratégias de manejo e preservação (CAMPOS *et al.* 2018; BITTENCOURT *et al.*, 2019; ROBERTO *et al.*, 2020, AMAVET *et al.*, 2023). Neste contexto, a genética da conservação tem se mostrado uma ferramenta essencial para investigar a estrutura genética dessas populações, contribuindo para a manutenção da variabilidade biológica e reduzindo os riscos de extinção.

Atualmente, são reconhecidas 26 espécies de crocodilianos (EATON 2010; HEKKALA *et al.* 2011; SHIRLEY *et al.* 2014, 2018; VLIET *et al.* 2024) podendo ser encontrados em quase todos os continentes, com exceção da Europa e da Antártica, sendo a América do Sul a responsável por abrigar a maior diversidade do mundo de indivíduos desse grupo, sendo, ao todo, habitat para 8 espécies (RIFF *et al.* 2012; FIGUEIREDO, 2019). Apesar da relativa estabilidade da sistemática do grupo, revisões taxonômicas ainda são necessárias, visto que algumas populações podem apresentar linhagens crípticas não detectadas por

métodos tradicionais. Essa questão reforça a necessidade de estudos aprofundados sobre a genética desses animais, principalmente para garantir a precisão da classificação e das medidas de conservação adotadas (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; ROBERTO *et al.*, 2020).

Além da relevância ecológica e científica, os crocodilianos têm importância para comunidades humanas em diferentes regiões, sendo utilizados de maneira tradicional como recurso alimentar e econômico. Contudo, a exploração inadequada, aliada à degradação ambiental, representa desafios para a preservação das espécies. A compreensão da diversidade genética, portanto, não apenas enriquece o conhecimento sobre a biologia do grupo, mas também subsidia estratégias eficazes para a manutenção dos estoques populacionais e a sustentabilidade do uso desses animais (SIROSKI *et al.*, 2021).

Os avanços na genética molecular vêm permitindo o desenvolvimento de novos métodos de análise que auxiliam na tomada de decisões para a conservação das espécies. Esses métodos utilizam do DNA (completo ou de regiões) para inferir a diversidade genética intra ou interespecífica (FARIAS *et al.*, 2021). A combinação de estudos genéticos e ecológicos tem sido essencial para estabelecer medidas adequadas de manejo, garantindo que as populações de crocodilianos permaneçam viáveis a longo prazo e desempenhem suas funções ecológicas nos ecossistemas onde estão inseridas (VALE; DOS SANTOS MARTINS, 2023). Diante deste contexto, o presente estudo visou realizar uma revisão dos métodos usados para avaliar a diversidade genética em crocodilianos, ressaltando sua importância para a conservação e os desafios existentes na delimitação taxonômica do grupo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Importância da Diversidade Genética nos Crocodilianos

A diversidade genética é um dos pilares fundamentais para a adaptação e evolução das espécies, sendo crucial para a manutenção da resiliência populacional diante das mudanças ambientais e da pressão seletiva (MUKHOPADHYAY & BHATTACHARJEE, 2016). No caso dos crocodilianos, a variação genética permite que diferentes populações desenvolvam mecanismos adaptativos para lidar com os desafios ecológicos, como a disponibilidade de recursos, alterações climáticas e interações com outras espécies (AMAVET *et al.*, 2021).

A presença da variabilidade genética é essencial para evitar problemas como a endogamia, que pode levar ao acúmulo de mutações deletérias e reduzir a viabilidade das populações. Além disso, a perda da diversidade genética pode comprometer a resposta imunológica dos crocodilianos a patógenos emergentes, tornando-os mais vulneráveis a doenças e outros estresses ambientais (SIROSKI *et al.*, 2021).

A conservação da diversidade genética de uma espécie depende do conhecimento sobre sua história evolutiva recente, bem como das mudanças que influenciam sua variabilidade genética de forma integrada. Além disso, compreender as características demográficas fundamentais das populações é essencial para a formulação de estratégias eficazes de manejo e preservação (FARIAS *et al.*, 2021).

A fragmentação dos habitats, causada pela degradação ambiental e pela interferência humana, tem sido um dos principais fatores de redução do fluxo gênico entre populações de crocodilianos. Esse isolamento pode resultar na diminuição da diversidade genética dentro das populações, aumentando o risco de extinção local e comprometendo a estabilidade das espécies ao longo do tempo (SAUNDERS, 1991; VALE; DOS SANTOS MARTINS, 2023).

2.2 Métodos utilizados para Análise da Variabilidade Genética

Os avanços nas técnicas de biologia molecular proporcionaram ferramentas cada vez mais precisas para o estudo da diversidade genética dos crocodilianos. Essas metodologias possibilitam a compreensão da estrutura genética das populações, a identificação de linhagens distintas e o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação. A

aplicação desses métodos tem sido fundamental para detectar padrões de fluxo gênico, estrutura populacional e impactos das mudanças ambientais na variabilidade genética das espécies (FARIAS *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

Entre os principais métodos utilizados na análise das variações genéticas podemos destacar:

2.2.1 Métodos a base de polymerase chain reaction (PCR)

2.2.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction, descrita por Kary Mullis (MULLIS *et al.* 1986), consiste na replicação *in vitro* de uma sequência específica de uma molécula de DNA, permitindo formação de bilhões de cópias desta sequência em aproximadamente 2 horas de reação. A técnica tem como princípio a replicação do DNA catalisada pela enzima DNA polimerase. Para realizar o processo de replicação pela DNA polimerase é necessário: adição de um par de iniciadores ou primers com um grupo 3'-OH terminal, ao qual podem ser adicionados novos nucleotídeos na cadeia em crescimento; os quatro trifosfatos de desoxirribonucleotídeo (dNTPs, os substratos para a DNA polimerase), íons magnésio; e outros sais necessários para a reação (JOSHI & DESHPANDE, 2010; PIERCE, 2016).

Neste processo, as duas fitas de DNA servem como molde, durante a replicação do DNA, e a quantidade será dobrada em cada evento da replicação. Os primers usados na PCR para replicar os moldes são fragmentos curtos de DNA, em geral, de 17 a 25 nucleotídeos, que são complementares a sequências alvo a serem replicadas (PIERCE, 2016).

Um ciclo da reação da PCR, ocorre em três etapas: na primeira, a mistura da reação contendo DNA molde, DNA polimerase, tampão da DNA polimerase, dNTP e primers é aquecida entre 90° e 100 °C, num aparelho termociclador, para romper as pontes de hidrogênio entre as fitas e produzir os moldes de fita única. A mistura reacional é mantida nesta temperatura por apenas um minuto ou dois. Na etapa 2, a reação de PCR é resfriada rapidamente entre 30° e 65 °C e mantida a esta temperatura por um minuto ou menos. Durante este curto intervalo, as fitas de DNA não têm chance de renaturar, e assim os primers serão capazes de se fixar às fitas molde por complementariedade de bases. Na etapa 3, a reação é aquecida entre um e três minutos a 72 °C, a temperatura na qual a DNA

polimerase consegue sintetizar novas fitas de DNA. No final do ciclo, duas moléculas de DNA de fita dupla novas são produzidas para cada molécula original do DNA-alvo (PIERCE, 2016; GREEN & SAMBROOK, 2019).

O ciclo é então repetido em média 30 vezes. Em cada ciclo, a quantidade de DNA-alvo dobra, então a quantidade de DNA-alvo aumenta geometricamente e no final de 30 ciclos, são produzidas mais de 1 bilhão de moléculas novas de DNA. Cada ciclo é completado dentro de alguns minutos, então pode ser obtida uma grande amplificação de DNA dentro de algumas horas (JOSHI & DESHPANDE, 2010; PIERCE, 2016; GREEN & SAMBROOK, 2019).

Em crocodilianos esta técnica é empregada na genotipagem, na identificação de mutações e na caracterização de polimorfismos genéticos (ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021). Além disso, quando associada a outros métodos, como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), permite a quantificação da expressão gênica, auxiliando na avaliação de respostas fisiológicas e ecológicas das populações de crocodilianos a diferentes pressões ambientais (ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

Outras variações dessa técnica vêm sendo amplamente utilizadas para análises genéticas mais específicas. A PCR multiplex, por exemplo, permite a amplificação simultânea de diferentes *loci*, otimizando o tempo e os recursos laboratoriais. Outra variação importante é a PCR digital, que melhora a sensibilidade da detecção ao dividir a amostra em milhares de reações individuais, tornando a quantificação mais precisa. Essas inovações ampliam o uso da PCR na genotipagem, análise de diversidade genética e identificação de variantes genéticas que podem estar associadas à adaptação de crocodilianos a diferentes ambientes (ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

2.2.1.2 Amplificação randômica de dna polimórfico (RAPD)

A técnica de Amplificação Randômica de DNA Polimórfico, do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), é uma metodologia baseada na PCR que permite a amplificação aleatória de fragmentos de DNA genômico, gerando perfis de bandas polimórficas sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência do DNA. É amplamente utilizada em estudos de diversidade genética, identificação de marcadores moleculares e taxonomia. Essa técnica é rápida e de baixo custo, permitindo a obtenção de dados sobre a diversidade genética intra e interespecífica (HADRYIS, BALICK & SCHIERWATER 1992; TINGEY, RAFALSKI & HANAFEY 1994; SIROSKI *et al.*, 2021). As

principais etapas da técnicas são: 1- Extração do DNA Genômico (O DNA genômico é extraído da amostra biológica e purificado para garantir a qualidade da amplificação); 2- Amplificação por PCR com primers randômicos (A RAPD utiliza primers curtos (geralmente de 10 bases) de sequência arbitrária, que se ligam a regiões complementares dispersas ao longo do genoma). 3- Amplificação de Fragmentos Polimórficos (O padrão de amplificação depende da sequência do primer e sua distribuição no genoma, resultando em fragmentos de tamanhos variados). Como a amplificação é aleatória, mesmo pequenas diferenças genômicas podem levar à ausência ou presença de determinadas bandas; 4- Separação e Análise dos Fragmentos por Eletroforese (Os produtos de PCR são separados por eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio ou corantes fluorescentes). O padrão de bandas obtido reflete variações genéticas entre as amostras analisadas. (HADRYN, BALICK & SCHIERWATER 1992; TINGEY, RAFALSKI & HANAFEY 1994).

Embora seja um método útil para investigações preliminares, o RAPD apresenta limitações, como baixa reprodutibilidade e dificuldade na padronização dos resultados. No entanto, quando combinado com outras abordagens moleculares, pode fornecer *insights* valiosos sobre a estrutura genética de crocodilianos e contribuir para estratégias de manejo e conservação (SIROSKI *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

O uso do RAPD em estudos genéticos também enfrenta desafios relacionados à sua reprodutibilidade e ao risco de amplificação inespecífica. Pequenas mudanças nos reagentes ou nas condições da PCR podem resultar em perfis genéticos diferentes, tornando sua aplicação menos confiável para análises comparativas de longo prazo. Para minimizar essas limitações, o RAPD costuma ser combinado com outros métodos, como os microssatélites e os SNPs, que fornecem dados mais robustos (SIROSKI *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021). Ainda assim, seu baixo custo e simplicidade fazem com que essa técnica continue sendo empregada em estudos exploratórios de diversidade genética.

2.2.1.3 Polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados (AFLP)

A técnica de Polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados, do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), é uma metodologia baseada na PCR e utilizada para a análise de polimorfismos no DNA genômico, sendo amplamente aplicada em estudos de genética, evolução, taxonomia e melhoramento genético. O método AFLP

combina a digestão enzimática do DNA com a amplificação seletiva de fragmentos específicos, permitindo a detecção de variações genéticas entre indivíduos sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência do DNA (VOS *et al.*1995; BLEARS *et al.*, 1998). É altamente sensível e reprodutível, sendo utilizada para estudos de diversidade genética, identificação de marcadores genéticos e análise de variações genômicas em plantas, animais e microrganismos (VOS *et al.*1995).

O procedimento pode ser dividido em três etapas principais: 1- O DNA genômico é digerido com duas enzimas de restrição: uma de corte frequente (por exemplo, *MseI*) e outra de corte raro (por exemplo, *EcoRI*). Isso gera fragmentos de tamanhos variados e Adaptadores sintéticos de sequência conhecida são ligados às extremidades dos fragmentos de DNA digeridos. Esses adaptadores servem como locais de ancoragem para os primers na amplificação subsequente; 2- Uma primeira PCR pré-seletiva é realizada utilizando primers complementares às sequências dos adaptadores. 3- Em seguida, uma segunda PCR seletiva é conduzida com primers mais seletivas, reduzindo ainda mais o número de fragmentos amplificados. Esse processo permite a obtenção de padrões distintos de bandas, que podem ser analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida ou em sequenciadores automáticos. A separação dos fragmentos amplificados ocorre por eletroforese em gel de poliacrilamida ou sequenciamento capilar, resultando em um padrão de bandas característico para cada indivíduo ou população analisada (VOS *et al.*1995; WANG *et al.* 2006; YAN *et al.* 2006).

Entre as principais vantagens do AFLP, destaca-se a sua alta capacidade de detectar variações genômicas sem a necessidade de informações prévias sobre o genoma do organismo estudado. No caso dos crocodilianos, o AFLP tem se mostrado uma ferramenta eficaz para identificar polimorfismos ao longo do genoma, permitindo inferências detalhadas sobre variabilidade intra e interespecífica (BLEARS *et al.*, 1998; SHEEJA *et al.*, 2021). Além disso, essa metodologia permite o rastreamento da conectividade genética entre populações isoladas geograficamente, auxiliando na definição de unidades de conservação prioritárias para crocodilianos ameaçados de extinção (VOS *et al.*1995; WANG *et al.* 2006; YAN *et al.* 2006).

O AFLP também tem sido amplamente utilizado para diferenciar populações e identificar híbridos naturais entre espécies de crocodilianos, auxiliando na definição de estratégias de manejo e conservação. Além disso, sua aplicabilidade em análises de diversidade genética tem possibilitado a identificação de padrões de variabilidade dentro e

entre populações, sendo uma ferramenta essencial para embasar ações de preservação de crocodilianos ameaçados (WANG *et al.* 2006; YAN *et al.* 2006).

Apesar de ser uma ferramenta poderosa para a análise da diversidade genética, o AFLP apresenta algumas limitações. A necessidade de equipamentos específicos para a visualização das bandas, além do potencial para baixa reprodutibilidade entre laboratórios, pode dificultar a comparação de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa. No entanto, quando combinada com outras técnicas moleculares, como microssatélites e sequenciamento de DNA de nova geração (NGS), essa metodologia fornece uma abordagem robusta para o estudo da biologia e evolução dos crocodilianos, contribuindo para estudos filogenéticos e evolutivos (SHEEJA *et al.*, 2021).

2.2.1.4 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A técnica *PCR-RFLP* (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição associado à PCR) é uma metodologia utilizada para detectar variações genéticas em sequências de DNA, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ou mutações específicas. Essa técnica combina a amplificação do DNA por PCR com a digestão enzimática por endonucleases de restrição, permitindo a diferenciação de variantes alélicas com base no tamanho dos fragmentos gerados (BOTSTEIN *et al.* 1980; WOLF, RENTSCH & HÜBNER, 1999).

Etapas Principais da Técnica PCR-RFLP:

1. Extração e Purificação do DNA: O DNA genômico é extraído da amostra e purificado para garantir a qualidade da amplificação.
2. Amplificação da Região de Interesse por PCR: Um par de primers específicos é utilizado para amplificar uma região alvo do DNA que contém o polimorfismo ou mutação de interesse. A PCR gera um fragmento de DNA de tamanho conhecido.
3. Digestão Enzimática com Endonucleases de Restrição: A sequência amplificada é incubada com uma enzima de restrição específica que reconhece e corta um sítio particular dentro do fragmento de DNA. Caso a sequência contenha uma mutação ou variação genética, o sítio de restrição pode estar presente ou ausente, resultando em padrões de fragmentação distintos.

4. Separação dos Fragmentos por Eletroforese: Os fragmentos de DNA gerados pela digestão enzimática são separados em um gel de agarose ou poliacrilamida e visualizados por coloração (brometo de etídio, SYBR Green, etc.). A análise do padrão de fragmentos permite a identificação dos diferentes genótipos.

Aplicações da Técnica PCR-RFLP: genotipagem de SNPs e mutações, estudos de diversidade genética e evolução molecular, diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, identificação de espécies e diferenciação de linhagens microbianas (BOTSTEIN *et al.* 1980; WOLF, RENTSCH & HÜBNER, 1999).

Uma das principais vantagens da PCR-RFLP é seu custo relativamente baixo em comparação com outras técnicas moleculares mais avançadas. Além disso, essa metodologia não requer equipamentos sofisticados, sendo acessível para laboratórios com recursos limitados. No entanto, sua aplicabilidade pode ser restrita pela necessidade de conhecimento prévio das sequências alvo, além da limitação na quantidade de polimorfismos detectáveis (WOLF, RENTSCH & HÜBNER, 1999; BROWN, 2001; FARIAS *et al.*, 2021).

A PCR-RFLP é amplamente utilizada para identificação de haplótipos, análise de variação genética em genes específicos e estudos de filogeografia. Embora seja considerada uma técnica de menor resolução quando comparada a sequenciamento ou PCR em tempo real, ainda é uma ferramenta útil para investigações genéticas em espécies pouco estudadas ou em projetos de menor escala (WILLIAMS, 1989; WILLIAMS *et al.* 1990; WOLF, RENTSCH & HÜBNER, 1999).

Os métodos de análise da variação genética desempenham um papel fundamental na compreensão da diversidade biológica dos crocodilianos e na formulação de estratégias eficazes de conservação. O aprimoramento dessas técnicas tem permitido investigações mais detalhadas sobre a estrutura genética das populações, contribuindo para a manutenção da variabilidade genética e a mitigação dos impactos ambientais sobre essas espécies (MEGANATHAN *et al.*, 2009; FARIAS *et al.*, 2021).

2.2.1.5 Repetição de sequências simples internas (ISSR)

A técnica Repetição de sequências simples internas (ISSR), do inglês Inter Simple Sequence Repeat, é um método baseado em PCR que amplifica regiões do DNA situadas

entre microssatélites (*Simple Sequence Repeats – SSRs*), utilizando primers ancorados nessas sequências repetitivas. É amplamente empregada em estudos de diversidade genética, filogenia e melhoramento genético, pois permite detectar variações genéticas sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência do genoma. Esse método é eficaz para detectar variabilidade genética e padrões de estrutura populacional entre crocodilianos (SHAFIEI-ASTANI *et al.* 2015).

Etapas Principais da Técnica ISSR:

1. Extração e Purificação do DNA: O DNA genômico é extraído e purificado para garantir qualidade e integridade na amplificação.
2. Seleção de Primers Específicos para Microssatélites: Os primers utilizados na ISSR são desenhados com base em sequências de repetições simples (como di-, tri- ou tetranucleotídeos), podendo estar completamente dentro da repetição ou ancorados na região adjacente ao final da repetição.
3. Amplificação por PCR: O DNA é amplificado por PCR utilizando primers complementares às regiões de microssatélites dispersas no genoma. Dependendo do arranjo dessas repetições e do número de cópias no genoma, diferentes padrões de amplificação são gerados.
4. Separação dos Fragmentos por Eletroforese: Os fragmentos amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida e visualizados por coloração (brometo de etídio, SYBR Green, entre outros). O padrão de bandas obtido reflete variações no número e disposição das sequências repetitivas no genoma.

Aplicações da Técnica ISSR: estudos de diversidade genética e estrutura populacional, filogenia e taxonomia molecular, genotipagem de organismos sem genoma de referência (ZIETKIEWICZ, RAFALSKI & LABUDA, 1994)

Os marcadores ISSR são altamente polimórficos e não requerem conhecimento prévio do genoma da espécie estudada, tornando-se uma ferramenta acessível para investigações populacionais. Essa abordagem é útil para distinguir linhagens geneticamente diferenciadas e para monitorar a conectividade genética entre populações fragmentadas (SHAFIEI-ASTANI *et al.* 2015).

Apesar das vantagens do ISSR, como sua facilidade de aplicação e alta taxa de polimorfismo, essa técnica apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. A principal dificuldade está na sua baixa reprodutibilidade, uma vez que pequenas variações nas condições experimentais podem gerar perfis distintos. Além disso, por ser um método baseado na amplificação aleatória, ele pode não fornecer um panorama genético tão

detalhado quanto os SNPs ou os microssatélites (SHAFIEI-ASTANI *et al.* 2015). No entanto, devido à sua eficiência na detecção de variabilidade genética sem a necessidade de informações genômicas prévias, o ISSR continua sendo uma ferramenta relevante para investigações genéticas em crocodilianos, desde estudos sobre a diversidade genética do grupo, estudos relacionados com os efeitos genéticos da perda da habita (MACHKOUR-M'RABET *et al.* 2009; NIE *et al.* 2012)

2.2.2 Métodos a base de sequenciamento de DNA

2.2.2.1 Sequenciamento sanger

O método de sequenciamento de DNA desenvolvido por Frederick Sanger e seus colegas, em meados dos anos 1970, é um método baseado na replicação do DNA por terminação de cadeia (SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977). No processo de replicação do DNA pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o DNA é sintetizado a partir de trifosfatos de desoxirribonucleotídeo (dNTPs), que têm um grupo OH no átomo do carbono 3'. No método de Sanger, um nucleotídeo modificado, chamado de trifosfato de didesoxirribonucleotídeo (ddNTP) é usado como um dos substratos. Os ddNTPs são idênticos aos dNTPs, exceto que eles não têm um grupo 3'-OH (VALENCIA, *et al.*, 2013)

Durante a síntese do DNA, os ddNTPs são incorporados à fita de DNA crescente. Entretanto, após um ddNTP ser incorporado à fita de DNA não podem ser mais adicionados nucleotídeos, porque não existe um grupo 3'-OH para formar uma ligação fosfodiéster com um nucleotídeo seguinte. Assim, os ddNTPs encerram a síntese de DNA. Desta forma, durante a síntese do DNA enquanto não for adicionada a base modificada a replicação continua produzindo fitas de DNA de diferentes comprimentos, cada qual termina num ddNTP específico. O sequenciamento utiliza corantes fluorescentes que se ligam a um ddNTP específico de forma que cada corante emite fluorescência de um comprimento de onda característico, o qual é lido por um sistema de escâner óptico e é detectado por um sistema detector de fluorescência. A informação é armazenada em um computador para interpretação e os resultados serão visualizados como um conjunto de picos em um gráfico, chamado de eletroferograma. As máquinas de sequenciamento automáticas podem ter 96

ou mais tubos capilares, permitindo que 50.000 a 60.000 pb de sequência sejam lidos em algumas horas (VALENCIA, *et al.*, 2013; PIERCE, 2016).

O sequenciamento de DNA é uma metodologia que permite a leitura precisa das bases nitrogenadas que compõem o genoma dos crocodilianos, possibilitando a identificação de polimorfismos nucleotídicos em genes e regiões regulatórias do DNA. Essa técnica é essencial para inferir relações evolutivas, delimitar unidades populacionais e identificar variações genéticas intra e interespecíficas (PAREEK, SMOCZYNSKI & TRETYN, 2011; BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020).

A utilização do sequenciamento genômico também tem auxiliado na identificação de regiões conservadas e variáveis dentro do DNA mitocondrial e nuclear, fornecendo dados para revisões taxonômicas e melhor compreensão da filogenia dos crocodilianos (FARIAS *et al.*, 2021). Além disso, por meio da comparação de sequências de diferentes populações, é possível detectar padrões de diferenciação genética e avaliar impactos ambientais na variabilidade genética das espécies (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020, FARIAS *et al.*, 2021).

2.2.2.2 Sequenciamento de nova geração

Com o avanço da tecnologia, o sequenciamento de nova geração (NGS - Next Generation Sequencing) tem permitido análises mais detalhadas, gerando um grande volume de dados genômicos e tornando-se uma ferramenta valiosa para estudos de conservação (OLIVEIRA, 2015; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021). Apesar dos avanços proporcionados pelo sequenciamento de DNA, alguns desafios ainda persistem, especialmente no que diz respeito à análise e interpretação dos dados. A necessidade de um genoma de referência bem estabelecido pode ser uma limitação para espécies pouco estudadas, como alguns crocodilianos. Além disso, os altos custos envolvidos nas análises de larga escala tornam essa abordagem mais restrita a projetos de pesquisa bem financiados (OLIVEIRA, 2015). No entanto, o desenvolvimento de técnicas como o sequenciamento de leitura curta e longa tem possibilitado um monitoramento genético das populações cada vez mais refinado, permitindo inferências detalhadas sobre evolução e adaptação das espécies ao ambiente (BALAGUERA-REINA *et al.* 2020; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021)

2.2.2.2.1 RADseq (Restriction site Associated DNA sequencing)

A técnica de Sítio de Restrição Associado ao Sequenciamento de DNA (RADseq) é uma abordagem baseada em sequenciamento de nova geração (NGS) que permite a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genomas sem a necessidade de informações prévias sobre a sequência do organismo. RADseq é amplamente utilizada em estudos de diversidade genética, mapeamento genético, filogenômica e genômica populacional.

Etapas Principais da Técnica RADseq:

1. Digestão do DNA com Enzimas de Restrição: O DNA genômico é digerido com uma enzima de restrição específica (por exemplo, *SbfI*, *EcoRI* ou *PstI*), que reconhece e corta sequências específicas no genoma. Esse passo gera fragmentos de tamanhos variados que contêm sítios de restrição conservados.
2. Ligação de Adaptadores Específicos, dois tipos de adaptadores são ligados aos fragmentos de DNA:

Um adaptador contendo um código de barras molecular (*barcode*), que permite a identificação de diferentes amostras dentro de uma mesma corrida de sequenciamento;

Um adaptador compatível com a plataforma de sequenciamento utilizada (por exemplo, Illumina).

3. Fragmentação e Seleção de Tamanho: Após a ligação dos adaptadores, os fragmentos de DNA podem ser fragmentados ainda mais para garantir que apenas um intervalo específico de tamanhos seja amplificado e sequenciado. Esse processo evita a geração de fragmentos excessivamente grandes ou pequenos.
4. Amplificação por PCR: Os fragmentos contendo adaptadores são amplificados por PCR para enriquecer as regiões de interesse. Esse passo reduz a complexidade do genoma e foca no sequenciamento de regiões específicas, aumentando a eficiência da técnica.
5. Sequenciamento de Alta Performance (NGS): Os fragmentos amplificados são sequenciados utilizando plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), como Illumina. O sequenciamento fornece dados de SNPs e padrões de variação genética entre indivíduos ou populações (BAIRD *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY *et al.* 2019).

A técnica de RADseq permite a análise de milhares de marcadores genéticos distribuídos ao longo do genoma. É particularmente útil para reconstruções filogenéticas e

identificação de estrutura populacional em crocodilianos, sendo uma alternativa eficiente ao AFLP devido à sua maior capacidade de resolução e confiabilidade na identificação de variações genômicas (CHATTOPADHYAY *et al.* 2019; FUKUDA *et al.* 2019). Estudos recentes demonstraram que o RADseq é especialmente útil para populações de crocodilianos com baixa diversidade genética, permitindo a identificação de padrões de fluxo gênico entre populações isoladas (MUNIZ *et al.*, 2018; AVILA-CERVANTES *et al.* 2020).

Pesquisas utilizando RADseq para análises de seleção natural sugerem que variações em genes específicos podem estar diretamente ligadas a características morfológicas e fisiológicas adaptativas em crocodilianos, auxiliando na diferenciação entre linhagens evolutivas e fornecendo dados importantes para estratégias de conservação (MUNIZ *et al.* 2018; LLOYD-JONES *et al.* 2023). Além disso, essa abordagem tem sido fundamental para a compreensão da estrutura genética populacional, permitindo inferências mais precisas sobre os impactos da fragmentação de habitats e do isolamento geográfico (MUNIZ *et al.* 2018). A crescente acessibilidade das tecnologias de sequenciamento tornou o RADseq uma ferramenta ainda mais relevante para estudos com crocodilianos. Uma das vantagens dessa técnica é a possibilidade de identificar padrões históricos de migração e expansão populacional, auxiliando na reconstrução da biogeografia das espécies ao longo do tempo (CHATTOPADHYAY *et al.* 2019; AVILA-CERVANTES *et al.* 2020).

Além disso, o RADseq tem sido aplicado para avaliar o impacto da fragmentação de habitats, permitindo inferências sobre a redução da conectividade genética entre populações devido à ação antrópica (AVILA-CERVANTES *et al.* 2020). Em crocodilianos que habitam regiões com diferentes regimes hidrológicos, como alagados sazonais e rios permanentes, essa técnica tem sido essencial para compreender adaptações genéticas associadas à variação no fluxo hídrico e à disponibilidade de recursos alimentares (AVILA-CERVANTES *et al.* 2020; LLOYD-JONES *et al.* 2023).

A combinação de metodologias como sequenciamento de DNA, PCR, ISSR, RAPD e microssatélites, aliada ao uso de SNPs e PCR-RFLP, proporciona uma abordagem abrangente para a identificação de linhagens evolutivas e para o monitoramento genético das populações de crocodilianos. Essas informações são essenciais para subsidiar programas de manejo sustentável e conservação, garantindo a preservação da biodiversidade ao longo do tempo (FARIAS *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

O aprimoramento contínuo das ferramentas genéticas tem permitido não apenas uma análise mais precisa da diversidade genética dos crocodilianos, mas também uma melhor compreensão dos fatores que influenciam sua distribuição e dinâmica populacional. A integração dessas metodologias ao monitoramento das populações selvagens pode fornecer *insights* valiosos para a conservação, permitindo a identificação de grupos geneticamente distintos que requerem atenção especial (FARIAS *et al.*, 2021). Além disso, novas abordagens, como o uso de sequenciamento de nova geração e estudos de transcriptômica, poderão expandir ainda mais nosso conhecimento sobre a adaptação desses animais ao ambiente. Para que tais avanços se traduzam em benefícios concretos, é essencial que os dados genéticos sejam incorporados a programas de manejo e conservação, garantindo a proteção das populações em longo prazo (VERDADE *et al.* 2021).

Essas metodologias, em conjunto, fornecem uma visão abrangente sobre a estrutura genética das populações de crocodilianos, permitindo a identificação de linhagens evolutivas distintas e auxiliando na formulação de estratégias de conservação (FARIAS *et al.*, 2021; VERDADE *et al.* 2021).

2.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares, como o nome infere, são regiões dentro do DNA (genoma) como marcas digitais que podem ser localizadas em partes do DNA de qualquer organismo vivo, podem apresentar variação (polimorfismos) entre dois indivíduos da mesma espécie ou espécies diferentes e, portanto, pode ser usado para responder a várias perguntas dentro da área da genética da conservação, que abrange desde o estudo da variação entre indivíduos e populações para estudos sobre relações filogenéticas (STRAKOVÁ, 2013; FARIAS *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

2.3.1 Microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats)

Os microssatélites, também conhecidos como SSRs - repetições de sequências simples, são repetições curtas e altamente polimórficas de nucleotídeos encontradas ao longo do genoma. Eles são amplamente utilizados na genética da conservação devido ao seu alto nível de variabilidade, tornando-os ideais para análises de parentesco, estrutura

populacional e diferenciação genética entre grupos. A técnica baseia-se na amplificação de loci específicos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de eletroforese para a separação e identificação dos alelos (PATWARDHAN, RAY & ROY, 2014; SIROSKI *et al.* 2021).

Além de serem altamente informativos, os microssatélites apresentam herança codominante, permitindo a distinção entre homozigotos e heterozigotos. Essa característica possibilita a obtenção de perfis genéticos detalhados, úteis para investigações sobre parentesco e fluxo gênico. Contudo, a necessidade de primers específicos para cada espécie e a complexidade na análise dos resultados podem representar desafios na utilização dessa técnica (VASHISTHA *et al.* 2020).

Outra limitação dos microssatélites é o seu custo relativamente elevado, especialmente no desenvolvimento inicial dos primers e na padronização dos protocolos. Além disso, os SSRs podem sofrer mutações por eventos de *slippage* (Deslizamento) durante a replicação do DNA, o que pode gerar variações no número de repetições e impactar a precisão das análises. Apesar disso, sua alta variabilidade continua sendo uma das maiores vantagens, tornando-os indispensáveis em estudos de conservação e manejo populacional (PATWARDHAN, RAY & ROY, 2014; VASHISTHA *et al.* 2020).

Considerando que a compreensão dos padrões de variação genética das espécies é essencial para sua conservação, os marcadores microssatélites surgem como uma ferramenta valiosa. Esses marcadores permitem analisar a estrutura populacional em escalas mais detalhadas e identificar as forças evolutivas em atuação. Dessa forma, possibilitam um conhecimento aprofundado sobre a dinâmica das populações e podem ser empregados no desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação (ARIYARAPHONG *et al.* 2023; VASHISTHA *et al.* 2020).

2.3.2 Marcadores Mitocondriais

Os marcadores mitocondriais são amplamente utilizados para análises filogenéticas, investigações de dispersão geográfica e identificação de linhagens maternas. O DNA mitocondrial (DNAmt) possui características que o tornam valioso para estudos populacionais, como herança exclusivamente materna, ausência de recombinação e alta taxa de mutação em algumas regiões. Genes como COI (citocromo oxidase subunidade I), CytB (citocromo B) e 16S rRNA são frequentemente analisados para inferências sobre

história evolutiva e conectividade entre populações (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021; PATWARDHAN, RAY & ROY, 2014).

Uma das principais vantagens do uso de marcadores mitocondriais é sua abundância e facilidade de extração, o que permite análises rápidas e eficientes. Além disso, a ausência de recombinação facilita a interpretação dos dados, pois as variações genéticas observadas refletem diretamente as relações maternas. No entanto, por ser herdado apenas da linhagem materna, o mtDNA fornece uma visão limitada da diversidade genética total de uma população, tornando essencial a complementação com marcadores nucleares (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021). Outro ponto a ser considerado é que a taxa de evolução do DNAm_t pode variar entre diferentes espécies, impactando a resolução dos estudos populacionais. Além disso, em algumas espécies, pode haver introgressão mitocondrial, onde indivíduos de uma população adquirem mitocôndrias de outra por meio de hibridização. Esses fatores devem ser levados em conta ao interpretar os resultados obtidos a partir de marcadores mitocondriais (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021; ROBERTO *et al.* 2021).

2.3.3 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) representam variações de um único nucleotídeo no DNA e são amplamente utilizados em estudos genéticos devido à sua abundância e distribuição uniforme pelo genoma. Essa metodologia permite análises de estrutura populacional, adaptação genética e identificação de loci associados a características fenotípicas. Os SNPs oferecem uma abordagem precisa e escalável, tornando-se uma escolha valiosa para estudos de biodiversidade (CAO *et al.* 2020; GVOŽDÍK *et al.* 2024; YANG *et al.* 2023).

A identificação e genotipagem de SNPs podem ser realizadas por diferentes técnicas, incluindo sequenciamento de nova geração (NGS), microarranjos de DNA e PCR em tempo real. A principal vantagem dos SNPs é sua alta reprodutibilidade e confiabilidade, permitindo a análise de milhares de loci simultaneamente. Isso torna possível detectar padrões de seleção natural, estimar taxas de migração entre populações e avaliar a resposta genética a fatores ambientais (CAO *et al.* 2020; GVOŽDÍK *et al.* 2024; YANG *et al.* 2023).

Apesar das vantagens, o uso de SNPs pode apresentar desafios, como a necessidade de um genoma de referência bem caracterizado para a identificação dos loci polimórficos.

Além disso, a obtenção de um número adequado de SNPs informativos requer uma amostragem populacional robusta e metodologias computacionais avançadas para a análise de grandes volumes de dados (CAO *et al.* 2020; GVOŽDÍK *et al.* 2024; YANG *et al.* 2023).

2.4 Variação Genética Intra e Interespecífica

A variabilidade genética refere-se à diversidade de indivíduos geneticamente distintos numa mesma espécie, resultante de fatores herdáveis e/ou ambientais (GREGORIUS, 1978). Quando as informações genéticas entre os indivíduos são muito semelhantes e há poucas variações alélicas, considera-se que a espécie apresenta baixa diversidade genética. Já a alta diversidade genética ocorre quando há grande variabilidade nos alelos de diferentes genes (PAIVA *et al.*, 2019; VERDADE *et al.* 2021). O estudo da diversidade genética desempenha um papel essencial na conservação das espécies, pois possibilita a identificação de genótipos distintos com características de interesse, como resistência a doenças e maior adaptabilidade ao ambiente. A análise dessa variabilidade pode ser realizada por meio de diferentes descritores, incluindo características morfológicas, citológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares (FALEIRO *et al.*, 2019; VERDADE *et al.* 2021).

A diversidade genética pode ser avaliada em dois níveis principais. A diversidade interespecífica refere-se à variabilidade genética existente entre diferentes espécies num mesmo ambiente ou região, sendo um fator importante para a compreensão da biodiversidade. Frequentemente, esse conceito é confundido com o de riqueza de espécies, que se limita ao número total de espécies em uma determinada área (PAIVA *et al.*, 2019; VERDADE *et al.* 2021). Já a diversidade intraespecífica corresponde à variação genética numa mesma espécie, resultante da recombinação genética e das mutações ao longo das gerações. A análise desses dois níveis é fundamental para o entendimento das relações evolutivas e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação (FALEIRO *et al.*, 2019; VERDADE *et al.* 2021).

A análise da variação genética intraespecífica (numa mesma espécie) é fundamental para entender a dinâmica das populações e a conectividade entre diferentes grupos. Em crocodilianos, essa variação pode ser influenciada por fatores ambientais, barreiras geográficas e histórico evolutivo. Populações isoladas geograficamente tendem a apresentar menor variabilidade genética, o que pode comprometer sua capacidade de

adaptação a mudanças ambientais (ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021; VERDADE *et al.* 2021) Por outro lado, a variação interespecífica (entre diferentes espécies) é essencial para a definição das relações evolutivas e da taxonomia dos crocodilianos. Estudos genéticos têm revelado que algumas espécies anteriormente consideradas como populações distintas podem, na verdade, representar linhagens evolutivas separadas. Da mesma forma, espécies morfologicamente similares podem apresentar diferenças genéticas significativas, justificando revisões taxonômicas e reforçando a necessidade de conservação de linhagens geneticamente diferenciadas (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; ROBERTO *et al.* 2021).

A identificação e preservação da variação genética intra e interespecífica são essenciais para garantir a sobrevivência das populações de crocodilianos no longo prazo. A aplicação de técnicas genéticas avançadas permite monitorar o fluxo gênico, detectar possíveis riscos de hibridização e avaliar o impacto das atividades humanas sobre a diversidade genética do grupo (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; VERDADE *et al.* 2021).

2.5 Aplicações dos Estudos de Diversidade Genética na Conservação dos Crocodilianos

Os crocodilianos desempenham um papel ecológico fundamental nos ecossistemas onde estão inseridos, sendo reconhecidos como indicadores de saúde ambiental, engenheiros ecossistêmicos e controladores de populações. Como espécies-chave, sua presença influencia diretamente o fluxo de energia e o ciclo de nutrientes nos ecossistemas aquáticos e terrestres, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico (SOMAWEERA *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021). Além da relevância ecológica e científica, os crocodilianos têm importância para comunidades humanas em diferentes regiões, sendo utilizados de maneira tradicional como recurso alimentar e econômico. Contudo, a exploração inadequada, aliada à degradação ambiental, representa desafios para a preservação das espécies. A compreensão da diversidade genética, portanto, não apenas enriquece o conhecimento sobre a biologia do grupo, mas também subsidia estratégias eficazes para a manutenção dos estoques populacionais e a sustentabilidade do uso desses animais (FARIAS *et al.*, 2021; SIROSKI *et al.*, 2021; VERDADE *et al.* 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021). Dessa forma, os estudos sobre sua diversidade genética, aliados à compreensão de seu comportamento e dinâmica populacional, são essenciais para a formulação de estratégias eficazes de

conservação. A análise da variabilidade genética dentro das populações permite identificar possíveis ameaças à sua sobrevivência, possibilitando a adoção de medidas que garantam a manutenção da biodiversidade e o avanço de teorias ecológicas e evolutivas voltadas para esse grupo (FARIAS *et al.*, 2021; SOMAWEERA *et al.*, 2020; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021). A integração dos estudos de diversidade genética com programas de conservação é fundamental para garantir a preservação das populações de crocodilianos, e a análise da estrutura genética das populações permite a identificação de áreas prioritárias para conservação, possibilitando a formulação de estratégias eficazes para o manejo das espécies (FARIAS *et al.*, 2021; SIROSKI *et al.*, 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021).

Além disso, a genética da conservação possibilita a detecção de populações geneticamente isoladas e a identificação de unidades de manejo distintas, garantindo que os esforços de conservação sejam direcionados de maneira eficiente. A avaliação da diversidade genética também pode contribuir para o desenvolvimento de programas de reprodução em cativeiro, evitando a perda de variabilidade e promovendo a reintrodução de indivíduos em habitats naturais (FARIAS *et al.*, 2021; VERDADE *et al.* 2021; ZUCOLOTO, FARIAS & AMAVET, 2021; VALE & DOS SANTOS MARTINS, 2023).

Dessa forma, a aplicação de métodos genéticos para a conservação dos crocodilianos é essencial para a mitigação dos impactos ambientais e para a sustentabilidade ecológica das populações (SOMAWEERA *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021; VERDADE *et al.* 2021). O uso combinado de diferentes ferramentas genéticas possibilita um monitoramento mais preciso das espécies e fornece subsídios científicos para a formulação de políticas de preservação. Neste sentido, o presente estudo visou realizar um levantamento das principais metodologias utilizadas na avaliação da diversidade genética em crocodilianos, no período de 1994 a 2024, avaliando as vantagens e desvantagens de cada método utilizado e os principais tipos de amostras biológicas utilizadas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar um levantamento das principais técnicas utilizadas para avaliar a diversidade genética molecular em crocodilianos.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar as principais técnicas moleculares envolvidas no estudo de diversidade genética em crocodilianos na escala temporal de 1994 a 2024.

3.2.2 Realizar um levantamento das espécies de crocodilianos que foram alvo de estudos de diversidade genética molecular.

3.2.3 Realizar um levantamento da origem das amostras biológicas utilizadas.

3.2.4 Identificar os tipos de amostras biológicas mais utilizadas entre os estudos.

3.2.5 Levantar os métodos de extração de DNA mais utilizados.

3.2.6 Levantar os marcadores moleculares utilizados nos estudos.

3.2.7 Comparar as técnicas moleculares mais utilizadas e apontar suas vantagens e desvantagens.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Revisão Sistemática de Literatura

De dezembro de 2024 a fevereiro de 2025 foi conduzida uma revisão sistemática de literatura minuciosa nas plataformas online de pesquisa PubMed, Scielo, Capes utilizando os seguintes termos descritores Diversidade Genética - Variabilidade Genética - Variação Genética combinando com os termos - Gavial - Crocodilo - Jacaré - Caiman - Alligator - Melanosuchus - Crocodylus - Osteolaemus - Mecistops - Gavialis - Tomistoma a partir da utilização dos operadores booleanos “AND” e/ou “OR”, as buscas foram feitas nos idiomas, português, inglês e espanhol, excluindo os documentos encontrados em qualquer outro idioma. Além das três plataformas de pesquisa já citadas, foi feito um levantamento bibliográfico detalhado dentro do site IUCN’s Crocodile Specialist Group’s (CSG—<http://www.iucncsg.org/>), na aba do CSG newsletter, utilizando os seguintes termos diversidade genética - variabilidade genética - variação genética - genética, dentro de cada edição publicada. A inclusão do CSG newsletter se fez por ser um dos, se não o principal site que aborda sobre os crocodilianos em todo o mundo.

Como critérios de inclusão foram usados os documentos que abordassem qualquer metodologia molecular para avaliar a diversidade genética intraespecífica e interespecífica entre crocodilianos. Foram excluídos estudos realizados especificamente em zoológicos europeus, estudos que tiveram foco em desenvolvimento de marcadores moleculares ou análises restritas a bioinformática, sem isolamento de material genético e que não avaliaram a diversidade genética molecular dentro de crocodilianos. Estudos que tiveram abordagem especificamente paleontológica, de múltipla paternidade, sistemas de acasalamento/parentesco e filogenética, na qual não apresentaram o estudo da diversidade genética entre crocodilianos, através de técnicas moleculares, como um dos objetivos da pesquisa, foram também excluídos. Na condução dessa pesquisa foram incluídas dissertações de mestrado, doutorado e artigos que estivessem disponíveis em uma das bases descritas anteriormente, livros e capítulos de livro, foram excluídas. Para os documentos que apareceram em mais de uma das bases, foi selecionado somente um e triado, para evitar duplicações. Publicações que não eram de acesso aberto na plataforma, foram obtidas através do Sci-Hub ou ResearchGate, para evitar dependência do tempo de resposta dos autores os documentos que precisavam ser solicitados diretamente ao autor também foram excluídos.

4.2 Levantamento e organização dos Dados

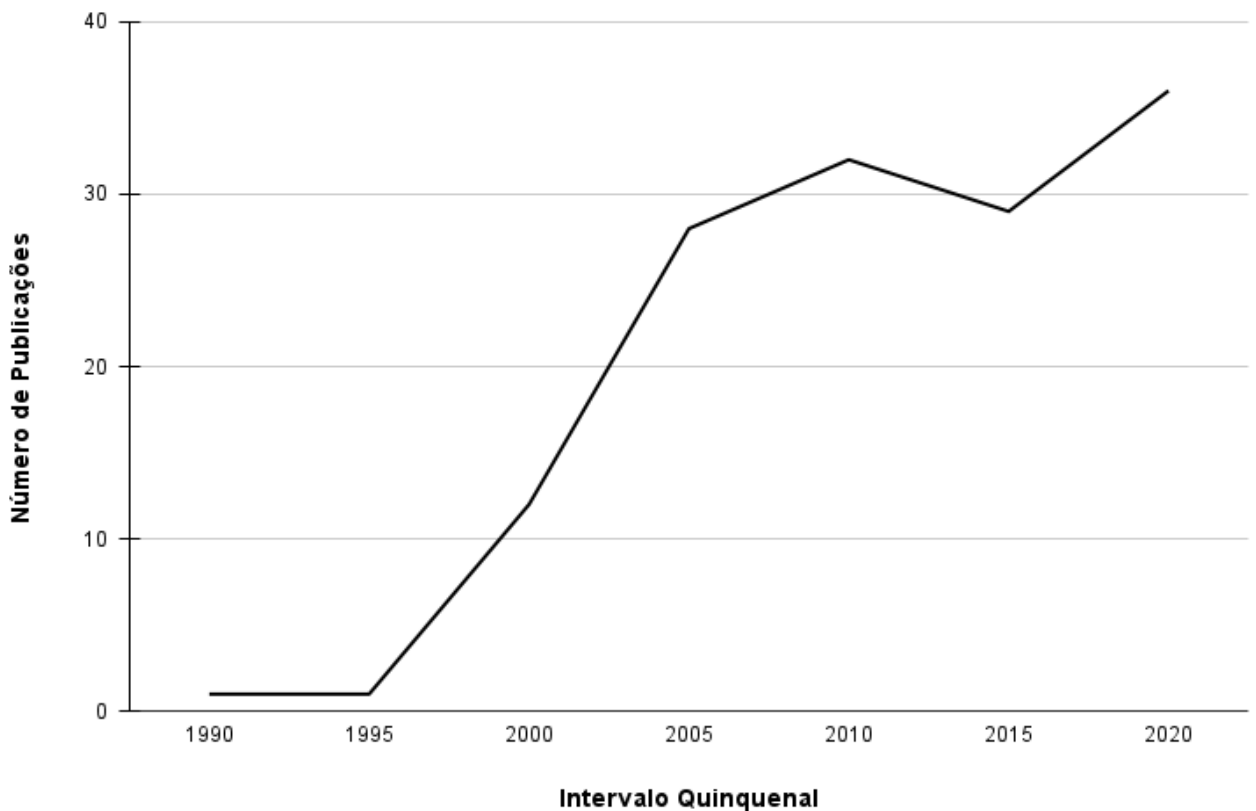
Para organizar e facilitar a extração de dados dos documentos selecionados, foi criada uma planilha online no Google Sheets. As informações foram estruturadas em colunas com os seguintes parâmetros: 1 Ano de Publicação: Registra o ano em que cada documento foi publicado. A partir desses dados, foi gerado um gráfico ilustrando a distribuição temporal das publicações (Figura 1 e 2). 2 Autor(es): Inclui o(s) autor(es) de cada publicação. 3 Título: Apresenta o título completo do documento. 4 Idioma: Especifica o idioma em que o documento foi publicado. 5 Tipo de Publicação: Classifica os documentos em categorias como artigo, tese, dissertação ou publicação no CSG. As colunas 2 e 3 foram inseridas com a finalidade de organização e identificação dos documentos, não sendo utilizadas para a análise quantitativa de dados. 6 Localização da Amostragem: Indica a origem geográfica das amostras analisadas nos estudos, considerando o nível de país, mesmo que mais de uma amostra veio de tal país, ele foi considerado somente uma vez por estudo, mantendo esse padrão para todos os estudos. Com base nesses dados, foi elaborado um mapa para visualizar a distribuição geográfica das amostras (Figura 4). 7 Espécie: Lista as espécies-alvo da pesquisa, cujos DNAs foram efetivamente extraídos e analisados em cada estudo. Não foram consideradas as espécies utilizadas como grupos externos ou comparativos de outros estudos. 8 Método Molecular Utilizado: Descreve o(s) método(s) molecular(es) empregado(s) e qual marcador molecular utilizado em cada publicação para a análise da diversidade genética. Com essas informações, foi elaborada uma tabela comparativa destacando as vantagens, desvantagens e os respectivos autores que utilizaram cada método (Tabela 2). 9 Tipo de Amostra Biológica: Especifica o tipo de material biológico utilizado para a extração de DNA em cada estudo. A partir dessas informações, foi gerado um gráfico para visualizar a frequência e a diversidade das amostras biológicas utilizadas ao longo das publicações (Figura 5). 10 Método de Extração de DNA: Apresenta os métodos de extração de DNA empregados em cada estudo. Com base nessas informações, foi criada uma tabela que destaca os métodos mais frequentemente utilizados ao longo das publicações (Tabela 1). Os estudos que abordaram mais de um método de extração, foram organizados como um método específico, não entrando na soma dos estudos que abordaram somente um método, mesmo que um dos protocolos tenha sido comum. Essa estruturação permitiu a organização sistemática dos dados, facilitando a análise comparativa e a visualização dos principais métodos e características relacionadas aos estudos sobre a diversidade genética em crocodilianos.

5 RESULTADOS

5.1 Escala temporal da diversidade genética em crocodilianos

Foram selecionados 194 documentos para a triagem inicial, encontrados na escala temporal de 1989 até 2024. Após a lida minuciosa dos documentos e a partir dos critérios de exclusão citados acima, 55 documentos foram excluídos, tendo um retorno de 139 publicações, incluindo: 5 dissertações de mestrado (3,6%), 2 teses de doutorado (1,4%), 2 publicações no site CSG newsletter (1,4%) e 130 artigos científicos (93,5%). O idioma mais utilizado foi o inglês, sendo o idioma de 133 (95,7%) publicações, seguido por português e espanhol, ambos com 3 (2,2%) documentos cada. Os documentos selecionados se estenderam do ano de 1994 a 2024. Analisando-se o intervalo de 5 anos, a partir de 1994, e estendendo-se até o ano de 2024, observa-se aumento progressivo no número de publicações (Figura 1).

Figura 1 – Quantidade de estudos publicados a cada 5 anos com objetivo de avaliar diversidade genética em crocodilianos.



5.2 Espécies de crocodilianos em estudos de diversidade genética

No presente estudo de revisão, foram identificadas 25 espécies de crocodilianos. Elas foram organizadas conforme a frequência em que apareceram como foco dos estudos, sendo distribuídas nas famílias: Alligatoridae (89 estudos), nos seguintes gêneros: *Alligator* (n= 21), *Caiman* (n= 41), *Melanosuchus* (n= 7), *Paleosuchus* (n= 20); Crocodylidae (n= 164 estudos) representada pelos gêneros *Crocodylus* (n=145), *Osteolaemus* (n=14), *Mecistops* (n=5), e Gavialidae (n= 16 estudos) com os gêneros *Gavialis* (n= 9), *Tomistoma* (n= 7) (Figura 2).

O gênero *Mecistops* foi o único que não teve todas as suas espécies analisadas, sendo *Mecistops leptorhynchus* (Bennett, 1835) a única espécie que não foi alvo de nenhuma das publicações levantadas. As quatro espécies mais frequentes estudadas foram *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807), que apareceu em 30 publicações, em seguida *Crocodylus porosus* (Schneider, 1801) com 19, *Crocodylus moreletii* (Duméril & Bibron, 1851) com 18, e então o primeiro representante da família alligatoridae, o *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) com 17 estudos. No nível de subespécie, foram identificadas quatro: três do gênero *Caiman* (*C. c. crocodilus*, *C. c. fuscus* e *C. c. apaporiensis*) e uma do gênero *Osteolaemus* (*O. t. tetraspis*) (Figura 3).

Figura 2 - Quantidade de estudos de diversidade genética representado por família de crocodilianos no período de 1994 a 2024.

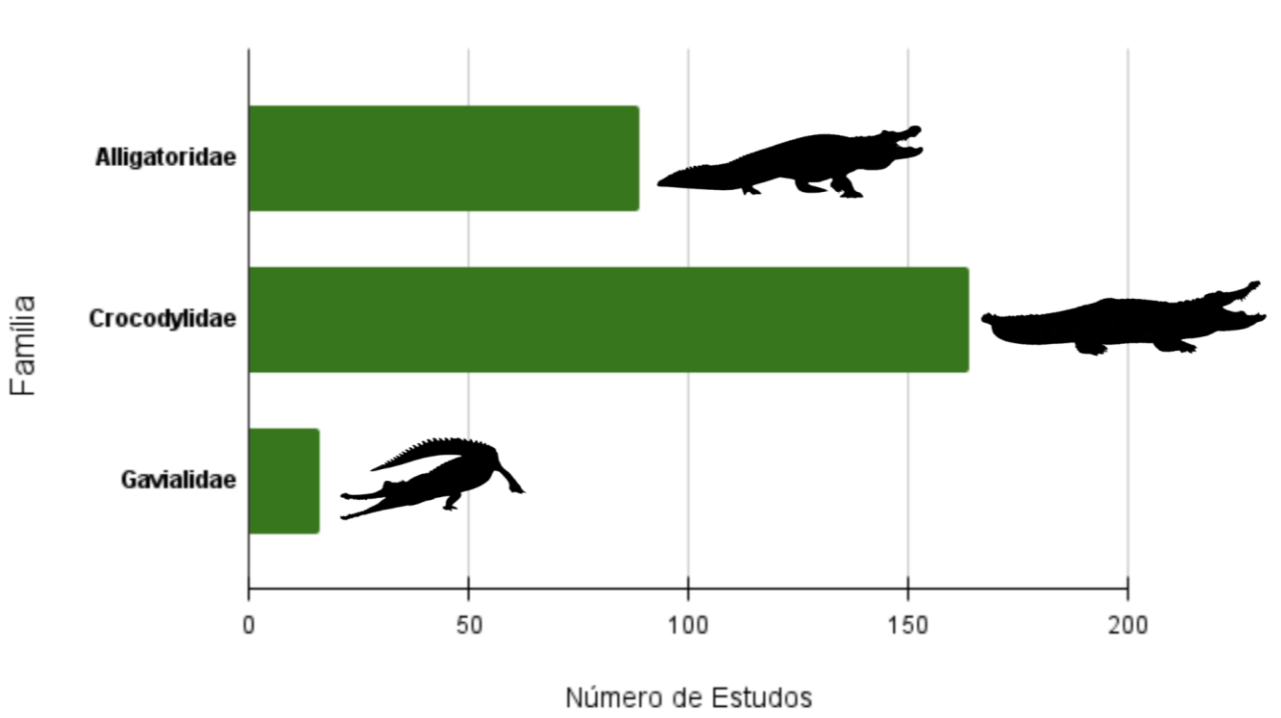
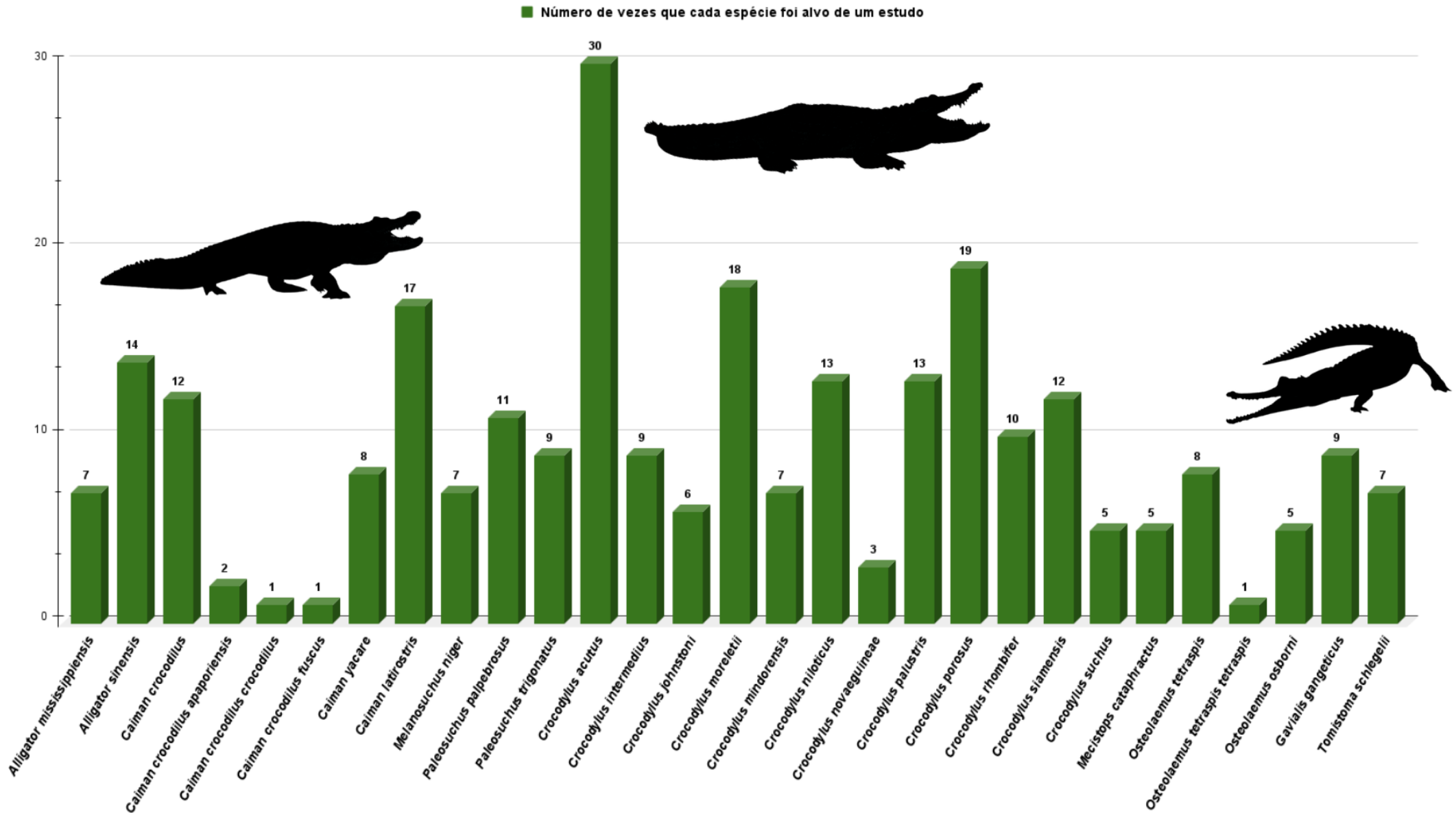


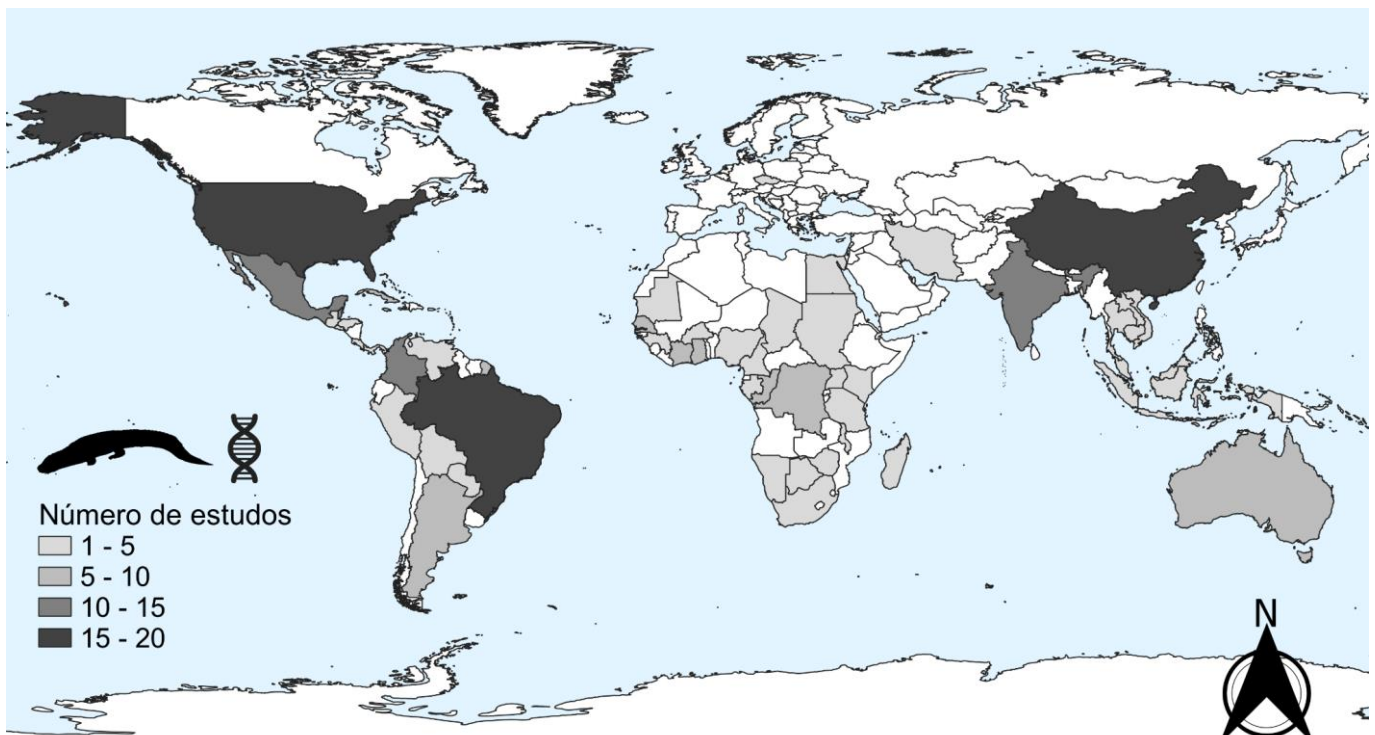
Figura 3 - Espécies de crocodilianos identificadas nos estudos de diversidade genética no período de 1994 a 2024.



5.3 Origem geográfica das amostras

No total, foram identificadas amostras de espécies provenientes de 59 países diferentes. Para visualizar a frequência na qual se deu a origem de cada amostra, foi gerado um mapa de calor (Figura 5). Os países mais citados foram Brasil, com 19 ocorrências, seguido por China, com 18, pelos Estados Unidos, com 17, e pelo México e Colômbia, com 13 ocorrências cada. Além disso, em sete publicações, a localização das amostras não foi informada.

Figura 4 - Mapa global representando a quantidade e procedência das amostras de crocodilianos nos estudos sobre diversidade genética, no período de 1994 a 2024.

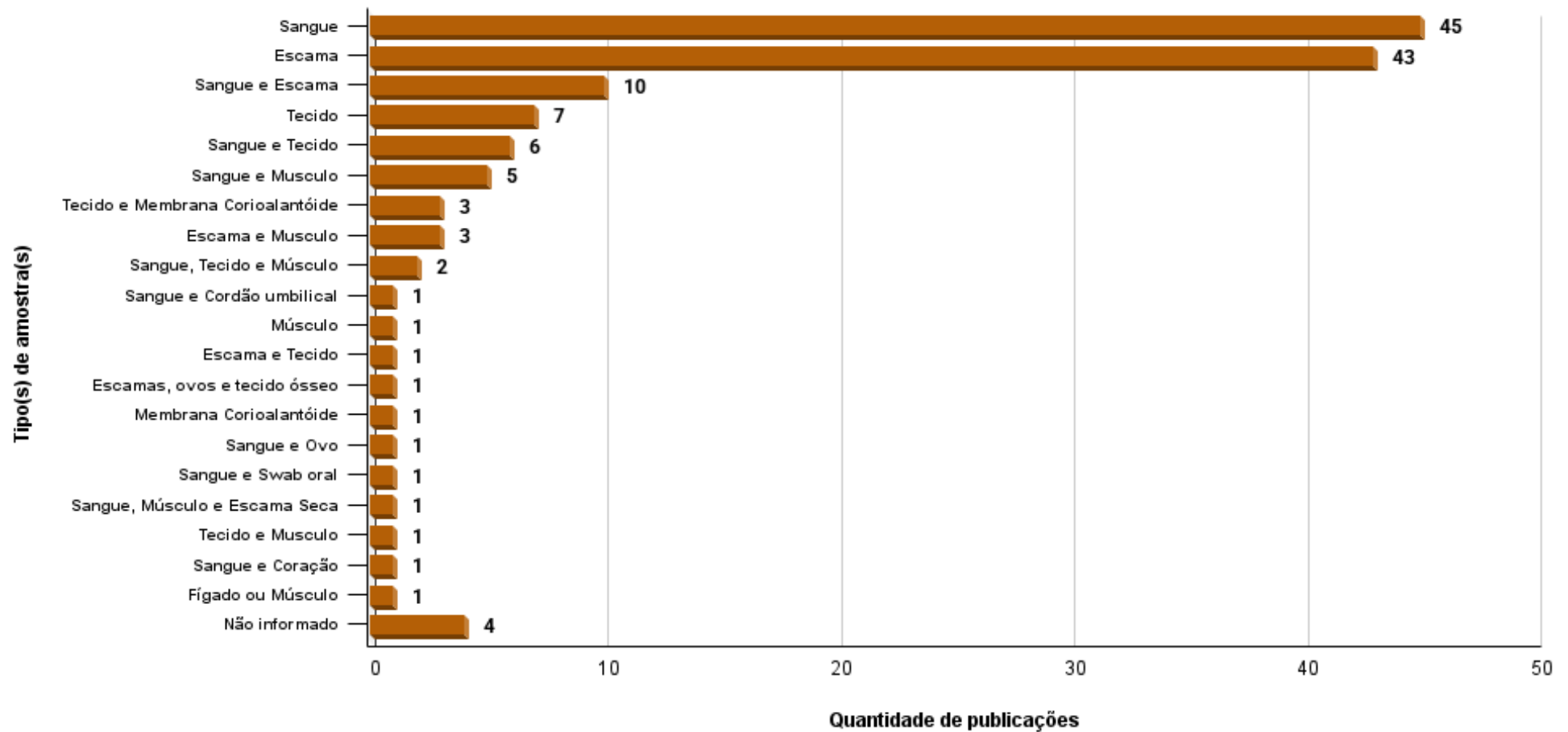


5.4 Tipos de Amostras Biológicas

O tipo de amostra biológica utilizada para extração de DNA, variou entre os estudos analisados. Foram utilizadas 12 tipos diferentes de amostras, sendo elas: sangue, escama, tecido, músculo, membrana corioalantóide, cordão umbilical, ovo, tecido ósseo, swab oral, escama seca, coração e fígado. Entretanto, alguns estudos, utilizaram mais de uma amostra biológica, sendo realizadas, no total, 20 combinações diferentes (Figura 6). As combinações de amostras mais utilizadas foram: somente sangue (32,4%) e somente escama (30,9%).

Figura 5 - Tipos de amostras biológicas utilizadas por estudos de diversidade genética em crocodilianos avaliados no período de 1994 a 2024.

Tipo de amostra usada por publicações



5.5 Métodos de extração de DNA

Os dez métodos de extração de DNA mais utilizados nos estudos foram organizados na tabela 1. Conforme, mostrado abaixo, o método mais utilizado foi o proposto por Sambrook *et al.* (1989), o método a base de fenol/clorofórmio, usado em 21 estudos, seguido pelo do kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) usado em 17 estudos. Contudo, sete estudos não informaram o método de extração/isolamento de DNA utilizado. Os métodos menos utilizados foram: Protocolo Sambrook *et al.* (1989) e Palumbi (1996) a base de fenol/clorofórmio, Protocolo Chong *et al.* (2000) também a base de fenol/clorofórmio e o Protocolo Doyle & Doyle (1987) com base no CTAB 2%, utilizados em 3 estudos cada.

Tabela 1 - Metodologias de extração de DNA utilizadas nos estudos de diversidade genética, com os princípios de cada método, vantagem, desvantagem e as amostras utilizadas em cada protocolo, no período de 1994 a 2024.

Método de extração e seu princípio	Tipo de amostras usadas	Vantagem	Desvantagem	Referências
Protocolo Sambrook <i>et al.</i> (1989) - Fenol/Clorofórmio	Sangue, Escama, Tecido, Músculo, Membrana Corioalantóide	Menor custo	Menos prático	Balaguera-Reina <i>et al.</i> (2020, 2020); Díaz-Moreno <i>et al.</i> (2021); Farias <i>et al.</i> (2004); FitzSimmons <i>et al.</i> (2001); Hrbek <i>et al.</i> (2008); Milián-García <i>et al.</i> (2011); Muniz (2012); Sharma <i>et al.</i> (2021, 2021); Singh <i>et al.</i> (2024); Thoisy <i>et al.</i> (2006); Vasconcelos <i>et al.</i> (2006, 2008); Vasconcelos <i>et al.</i> (2024); Wang <i>et al.</i> (2006); Wu <i>et al.</i> (2002); Xu <i>et al.</i> (2005); Xu & Fang (2006); Zhai <i>et al.</i> (2017); Zucoloto <i>et al.</i> (2006).
kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) - Tecnologia de colunas de membrana de sílica	Sangue, Escama, Tecido, Músculo, Cordão Umbilical, Membrana Corioalantóide, Coração	Maior praticidade	Maior custo	Barão-Nóbrega (2021); Campos <i>et al.</i> (2018); Chattopadhyay <i>et al.</i> (2019); Cunningham <i>et al.</i> (2016); Hekkala <i>et al.</i> (2015); Hernandez-Rangel <i>et al.</i> (2023); Mauger <i>et al.</i> (2017); Moncada-Jimenez <i>et al.</i> (2023); Pacheco-Sierra <i>et al.</i> (2016); Pan <i>et al.</i> (2021); Roberto <i>et al.</i> (2021); Rossi <i>et al.</i> (2020); Sharma <i>et al.</i> (2024); Villegas <i>et al.</i> (2022); Wilkie. (2022, 2024); Yang <i>et al.</i> (2023).

Continuação...

Método de extração e seu princípio	Tipo de amostras usadas	Vantagem	Desvantagem	Referências
DNEasy tissue kits (Qiagen,Valencia,CA) - Tecnologia de colunas de membrana de sílica	Sangue, Escama, Tecido, Músculo, Ovo, Tecido Ósseo, Escama Seca	Maior praticidade	Maior custo	Bishop <i>et al.</i> (2009); Eaton <i>et al.</i> (2009); Hekkala <i>et al.</i> (2010); Hoog <i>et al.</i> (2023); Russello <i>et al.</i> (2006); Ryberg <i>et al.</i> (2002); Smolensky <i>et al.</i> (2015); Yu <i>et al.</i> (2010).
Protocolo Sambrook & Russel (2001) - Fenol/Clorofórmio	Sangue, Tecido	Menor custo	Menos prático	Meganathan <i>et al.</i> (2009, 2010, 2011); Li <i>et al.</i> (2007); Nie <i>et al.</i> (2012, 2012, 2013); Yan <i>et al.</i> (2006).
Protocolo Murray & Thompson (1980) - CTAB 1% kit de extração de DNA	Sangue, Músculo	Menor custo	Menos prático	Amavet <i>et al.</i> (2007, 2008, 2009, 2012, 2015, 2017, 2023).
PureGene (Minneapolis, MN) - Precipitação seletiva do DNA	Sangue, Escama, Tecido, Músculo	Maior praticidade	Maior custo	Balaguera-Reina <i>et al.</i> (2021); González-Trujillo <i>et al.</i> (2012); Parks <i>et al.</i> (2023); Weaver <i>et al.</i> (2008).
NucleoSpin kit for DNA extraction (Macherey-Nagel, Düren, Germany) - Tecnologia de colunas de membrana de sílica	Escama	Maior praticidade	Maior custo	Castillo-Rodríguez <i>et al.</i> (2024); Milián-García <i>et al.</i> (2015, 2017, 2018).
Protocolo Sambrook <i>et al.</i> (1989) e Palumbi (1996) - CTAB 1% e Fenol/Clorofórmio	Sangue, Escama, Tecido	Menor custo	Menos prático	Bashyal <i>et al.</i> (2012, 2014); Venegas-Anaya <i>et al.</i> (2008);
Protocolo Chong <i>et al.</i> (2000) - Fenol/Clorofórmio	Sangue	Menor custo	Menos prático	Kaur & Ong, (2011); Kaur <i>et al.</i> (2013); Shafiei-Astani <i>et al.</i> (2015).
Protocolo Doyle & Doyle (1987) - CTAB 2%	Escama, Tecido	Menor custo	Menos prático	Muniz <i>et al.</i> (2019); Nadarajan <i>et al.</i> (2022); Roberto <i>et al.</i> (2020).

5.6 Métodos Moleculares para Avaliar a Diversidade Genética

Os métodos usados para a avaliação da diversidade genética, foram divididos em: 1- baseados no sequenciamento (Sanger ou NGS, ddRAD-seq/DArTseq/RAD-seq), e 2- baseados na PCR (ISSR-PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR e AFLP-PCR). Dentro de cada método, diferentes regiões foram utilizadas como mostrado nas tabelas 2 e 3. O método que mais foi usado nos estudos foi o método de sequenciamento sanger ou NGS, sendo frequente em 79 publicações (56,8%), abrangendo, tanto sequenciamento de genoma, de mtDNA completo ou marcadores moleculares do mtDNA, DNA nuclear e microssatélites (Tabela 2). Os marcadores moleculares mais utilizados para o método de sequenciamento sanger ou NGS foram: o CytB utilizado em 36 publicações (40,4%), COI em 22 (24,7%) publicações e então os microssatélites, em 18 publicações (20,2%). Já segundo método molecular mais utilizado foi a PCR com 39 estudos (28,1%) (Tabela 3). Os métodos moleculares menos utilizados foram AFLP-PCR e PCR-RFLP, cada um com duas publicações apenas (Tabela 3), ambas utilizaram o DNA nuclear para avaliar a diversidade genética.

Tabela 2 – Dois tipos de sequenciamento usados nos estudos, com os autores que utilizaram tal método e qual região do DNA foi avaliada e os marcadores moleculares utilizados

Método Molecular	Região do DNA Avaliada	Marcador Molecular Usado	Referências
Sequenciamento (Sanger ou NGS)	Genoma	-	Gvoždík <i>et al.</i> (2024); Yang <i>et al.</i> (2023).
	mtDNA	Completo ATP8, CR, COI, COII Cox1, CytB, CytB-CR, D-loop, ND3, ND4L, ND 6-tRNAGlu, trnP, trnF, VNTR, 12sRNA	Li <i>et al.</i> (2007); Feng <i>et al.</i> (2010); Meganathan <i>et al.</i> (2011); Man <i>et al.</i> (2011); Srikulnath <i>et al.</i> (2012), Pan <i>et al.</i> (2021). Amavet <i>et al.</i> (2023); Balaguera-Reina <i>et al.</i> (2020, 2020, 2021, 2022); Bittencourt <i>et al.</i> (2019); Bloor <i>et al.</i> (2015); Díaz-Moreno <i>et al.</i> (2021); Farias <i>et al.</i> (2004); Glenn <i>et al.</i> (2002); Hernandez-Rangel <i>et al.</i> (2023); Kaur <i>et al.</i> (2013); Luck <i>et al.</i> (2012); Meganathan <i>et al.</i> (2013); Meredith <i>et al.</i> (2011); Milián-García <i>et al.</i> (2017, 2018); Moncada-Jimenez <i>et al.</i> (2023); Mobaraki, FitzSimmons & Abtin Muggen (2014); Md Adzhar & Hassan (2017); Muniz (2012); Nadarajan <i>et al.</i> (2022); Parks <i>et al.</i> (2023); Posso-Peláez, Ibáñez & Bloor (2018); Ray <i>et al.</i> (2004); Ray & Densmore (2003); Roberto <i>et al.</i> (2020, 2021); Rochford <i>et al.</i> (2016); Schmitz <i>et al.</i> (2003); Serrano-Gomez <i>et al.</i> (2016); Sharma <i>et al.</i> (2021); Vasconcelos (2005, <i>et al.</i> 2006, <i>et al.</i> 2008); Villegas <i>et al.</i> (2022); Venegas-Anaya <i>et al.</i> (2008); Vasconcelos <i>et al.</i> (2024); Xu & Fang (2006).

Continuação ...

Método Molecular	Região do DNA Avaliada	Marcador Molecular Usado	Referências
	mtDNA e DNA nuclear	<i>mtDNA</i> (CytB, CytB-CR, COI, D-loop, ND4, 12s RNA, 16sRNA) e <i>DNA nuclear</i> (C-mos, LDH-A, nDNA; MYC, RAG-1, VNTR)	Borges <i>et al.</i> (2018); Eaton <i>et al.</i> (2009); Hrbek <i>et al.</i> (2008); Kaur & Ong (2011); Meganathan <i>et al.</i> (2010); Smolensky <i>et al.</i> (2015); Shirley <i>et al.</i> (2014, 2014); Tabora <i>et al.</i> (2012).
	DNA Nuclear	COX1, MHC, TTR intron 1	Liu <i>et al.</i> , (2007); Willis (2009); Jaratlerdsiri <i>et al.</i> , (2012); Ghosh <i>et al.</i> , (2019).
	mtDNA e microsatélites	CR, CytB, D-loop, ND4, rRNA, tRNAThr, tRNAPro, tRNAPhe, 12sRNA, 16sRNA,	Amavet <i>et al.</i> (2017); Ariyaraphong <i>et al.</i> (2023); Godshalk (2006); González-Trujillo <i>et al.</i> (2012); Hekkala <i>et al.</i> (2015); Lapbenjakul <i>et al.</i> (2017); Milián-García <i>et al.</i> (2015); Nguyen <i>et al.</i> (2018); Rossi <i>et al.</i> (2020); Russello <i>et al.</i> (2006); Sharma <i>et al.</i> (2021); van Asch <i>et al.</i> (2019); Velo-Antón <i>et al.</i> (2014); Weaver <i>et al.</i> (2008).
	mtDNA, DNA Nuclear e Microsatélites	CytB, CR-D-loop, COI (mtDNA) e C-mos, LDHA, Rag1 (DNA nuclear)	Milián-García <i>et al.</i> (2011); Straková (2013).
	DNA Nuclear e Microsatélites	MHC	Nie <i>et al.</i> , (2012, 2013); Zhai <i>et al.</i> , (2017).
Sequenciamento Sanger e ddRAD-seq	mtDNA	CytB	Muniz <i>et al.</i> (2018).
Sequenciamento NGS (dRAD-seq/ DArTseq/sRAD-seq)	DNA Nuclear	SNP	Avila-Cervantes <i>et al.</i> (2020); Barão-Nóbrega (2021); Cao <i>et al.</i> (2020); Chattopadhyay <i>et al.</i> (2019); Fukuda <i>et al.</i> (2019); Lloyd-Jones <i>et al.</i> (2023); Milián-García <i>et al.</i> (2020); Wilkie (2022, <i>et al.</i> 2024)

Tabela 3 Os métodos de PCR, ISSR-PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR e AFLP-PCR, com os autores que utilizaram tal método e qual região do DNA foi avaliada, para cada método molecular.

Método Molecular	Região do DNA Avaliada	Autores que Usaram
PCR	Microssatélites	Alarcón & Montenegro (2012); Amavet <i>et al.</i> (2008, 2012, 2015); Bashyal (2012, <i>et al.</i> 2014); Bishop <i>et al.</i> (2009); Campos <i>et al.</i> (2018); Castillo-Rodríguez <i>et al.</i> (2024); Chaeychomsri <i>et al.</i> (2008); Cunningham <i>et al.</i> (2016); Davis <i>et al.</i> (2002); Dever <i>et al.</i> (2002); Dever & Densmore (2001); FitzSimmons <i>et al.</i> (2001); Glenn <i>et al.</i> (1996); Hekkala <i>et al.</i> (2010); Hinlo <i>et al.</i> (2014); Hoog <i>et al.</i> (2023); Jogayya <i>et al.</i> (2013); Mauger <i>et al.</i> (2017); Muniz <i>et al.</i> (2019); Pacheco-Sierra <i>et al.</i> (2016); Pan <i>et al.</i> (2019); Quirino <i>et al.</i> (2023); Rodriguez <i>et al.</i> (2008); Ryberg <i>et al.</i> (2002); Saldarriaga-Gómez <i>et al.</i> (2023); Serna-Lagunes, González & Díaz-Rivera (2012); Sharma <i>et al.</i> (2024); Singh <i>et al.</i> (2024); Thoisy <i>et al.</i> (2006); Vashistha <i>et al.</i> (2021); Verdade <i>et al.</i> (2002); Villela <i>et al.</i> (2008); Xu <i>et al.</i> (2005); Yu <i>et al.</i> (2010); Zucoloto <i>et al.</i> (2006, 2021)
ISSR-PCR	Microssatélites	Machkour-M'Rabet <i>et al.</i> (2009); Nie <i>et al.</i> (2012); Shafiei-Astani <i>et al.</i> (2015).
PCR-RFLP	mtDNA	Meganathan <i>et al.</i> (2009).
	Genoma	Aggarwal <i>et al.</i> (1994).
RAPD-PCR	DNA Nuclear	Amavet <i>et al.</i> (2007, 2009); Murillo, <i>et al.</i> (2008); Wu <i>et al.</i> (2002).
AFLP-PCR	DNA Nuclear	Wang <i>et al.</i> (2006); Yan <i>et al.</i> (2006).

6 DISCUSSÃO

A análise da variação genética intraespecífica (numa mesma espécie) é fundamental para entender a dinâmica das populações e a conectividade entre diferentes grupos, influenciada por fatores ambientais, barreiras geográficas e histórico evolutivo. (VERDADE *et al.* 2021; VALE & DOS SANTOS MARTINS, 2023). Por outro lado, a variação interespecífica (entre diferentes espécies) é essencial para a definição das relações evolutivas e da taxonomia dos crocodilianos. Estudos genéticos têm revelado que algumas espécies anteriormente consideradas como populações distintas podem, na verdade, representar linhagens evolutivas separadas. Da mesma forma, espécies morfologicamente similares podem apresentar diferenças genéticas significativas, justificando revisões taxonômicas e reforçando a necessidade de conservação de linhagens geneticamente diferenciadas (BALAGUERA-REINA *et al.*, 2020; ROBERTO *et al.* 2021; VERDADE *et al.* 2021).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática relacionada com estudos de diversidade genética em crocodilianos, num intervalo temporal de 1994 a 2024. Com os dados analisados numa escala temporal de 5 anos, verificou-se uma linha crescente de publicações, inferindo que essa área continua sendo de interesse para a comunidade científica, dando fortes indícios de um aumento progressivo sobre essas publicações para os próximos anos.

Como descrito por Mazzotti *et al.* (2009), Somaweera *et al.* (2020) e Strickland *et al.* (2023), os crocodilianos possuem diversos papéis no ecossistema, sendo, portanto, de extrema importância para o equilíbrio ecossistêmico. Atualmente, são descritas 26 espécies de crocodilianos (EATON 2010; HEKKALA *et al.* 2011; SHIRLEY *et al.* 2014, 2018; VLIET *et al.* 2024) e destas, na presente revisão foram identificadas 25 espécies, o que mostra a grande representatividade do grupo dentro dessa temática, ficando de fora apenas a espécie *Mecistops leptorhynchus* (Bennett, 1835), mas como abordado em Shirley *et al.* (2018), esse é um epíteto que foi elevado a espécie recentemente, então é necessário revisões taxonômicas para confirmar se ela foi ou não abordada nos estudos. O *Crocodylus acutus*, foi a espécie mais estudada (30 vezes) por se tratar de um animal que possui grande distribuição, cerca de 18 países, dentre esses países, sendo ela uma das duas espécies de crocodilianos que ocorre em um dos países de mais investimento na pesquisa, o Estados Unidos (ROSSI *et al.* 2020; VILLEGAS *et al.* 2022 e. somado a isso, e talvez o motivo principal, essa é uma espécie que se encontra

em status vulnerável, segundo a IUCN *Red list*. Em seguida o *Crocodylus porosus* apareceu em 19 estudos, e como dito em Fukuda *et al.* (2019), é a espécie possui a maior amplitude geográfica de ocorrência entre os crocodilianos, mostrando o porquê de ser uma espécie bastante estudada. Logo após o *Crocodylus moreletii* (18 estudos), se mostra uma espécie importante por ocorrer em áreas de hibridização com o *C. acutus*, como mostra Pacheco-Sierra *et al.* (2016) e Wilkie (2022). Por fim, o primeiro representante da família alligatoridae, *Caiman latirostris* (17 estudos), mostrando sua importância por ser um crocodiliano de ampla distribuição geográfica e estar presente em grande parte da América do Sul (Roberto *et al.* 2020; Amavet *et al.* 2023). Além disso, 4 subespécies também foram identificadas, três do gênero *Caiman* (*C. c. crocodilus*, *C. c. fuscus* e *C. c. apaporiensis*) e uma do gênero *Osteolaemus* (*O. t. tetraspis*). Estes achados são importantes para o direcionamento de planos de manejo e conservação específicos em crocodilianos (RAY & DENSMORE, 2003; BALAGUERA-REINA *et al.* 2020, 2022; DÍAZ-MORENA *et al.* 2021)

Dos 193 países distribuídos pelo globo, 59 estavam presentes nas publicações, e em todos os continentes, exceto nos pólos, tendo sua maior diversidade distribuída pelo continente americano e africano (RIFF *et al.* 2012; GRIGG e KIRSHNER, 2015; FIGUEIREDO, 2019).

Os estudos selecionados utilizaram diversos grupos de amostras biológicas, como: 1- métodos não invasivos (sangue, membrana corioalantóide, swab oral, ovo); 2- métodos pouco invasivos (escama, músculo, cordão umbilical, escama seca); e 3- métodos pós morte (necrópsia como tecido ósseo, coração e fígado) (YANG *et al.* 2023; SHARMA *et al.* 2024). Além disso, alguns artigos realizaram combinações de amostras biológicas como em descrito por Hekkala *et al.* (2015), Hoog (2023) e Schmitz *et al.* (2003). Essas combinações usadas nos documentos se mostraram efetivas, principalmente para um maior rendimento na obtenção de DNA dos crocodilianos. Entre as amostras utilizadas nos estudos selecionados, sangue e escama foram as mais frequentes, provavelmente porque são amostras biológicas de fácil acesso, além de possuírem várias formas de serem armazenadas sem que o DNA seja muito degradado (SEUTIN, WHITE & BOAG 1991).

Em relação aos procedimentos utilizados para obtenção de DNA, todos se mostraram eficientes (VENEGAS-ANAYA *et al.* 2008; ROBERTO *et al.* 2020; HOOG, 2023; MONCADA-JIMENEZ *et al.* 2023; PARKS *et al.* 2023; CASTILLO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2024; VASCONCELOS *et al.* 2024). Contudo, o método mais utilizado foi o protocolo

de Sambrook *et al.* (1989). O método é a base de fenol/clorofórmio, e utiliza um conjunto de reagentes e condições que permitem a ruptura da célula, liberação do DNA e sua purificação, sendo utilizado por 21 estudos, para extração de amostras biológicas como sangue, escama, tecido, músculo, e membrana corioalantóide, demonstrando uma boa flexibilidade para extração de diferentes tipos de amostra (FARIAS *et al.* 2004; BALAGUERA-REINA *et al.* 2020; SHARMA *et al.* 2021). Uma das maiores vantagens da utilização deste método pelos estudos é o baixo custo, por ser uma técnica realizada “*in house*”.

O método de Sambrook & Russel (2001), tem a mesma base do protocolo de Sambrook *et al.* (1989), porém inclui métodos mais rápidos e eficientes, uso de novos reagentes comerciais, extrai DNA em larga escala, e utiliza técnicas de purificação. O protocolo foi utilizado por 8 estudos, para amostras biológicas de sangue e tecido (MEGANATHAN *et al.* 2009; 2011). O método “*in house*” de Murray & Thompson (1980), descrito em 7 estudos, utilizou o detergente catiônico brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 1%, para auxiliar no rompimento das membranas celulares e facilitar a remoção de contaminantes, como proteínas, lipídios e polissacarídeos, a partir de sangue e músculo (AMAVET *et al.* 2015; 2023).

Além disso, modificações no protocolo “*in house*,” foram realizadas em 6 das publicações, como adição de CTAB a 1% para extração de DNA (Sambrook *et al.*, 1989; Palumbi, 1996); e as realizadas por Chong *et al.* (2000). E os estudos que usaram o protocolo de Sambrook *et al.* (1989) em conjunto com Palumbi (1996) usaram sangue, escama e tecido para a extração (BASHYAL *et al.* 2012; 2014). Já os estudos que utilizaram o protocolo de Chong *et al.* (2000) utilizaram apenas sangue, como amostra biológica (KAUR *et al.* 2013; SHAFIEI-ASTANI *et al.* 2015).

A última técnica elencada “*in house*”, porém com seu princípio à base de CTAB 2%, foi a do protocolo de Doyle & Doyle (1987) utilizaram escama e/ou tecido como amostras biológicas (NADARAJAN *et al.* 2022; ROBERTO *et al.* 2020).

Para as extrações à base de kits, podemos destacar: 1- O kit DNeasy Blood & Tissue da Qiagen, que se baseia em um processo de purificação do DNA por colunas de membrana de sílica e com tampões específicos que facilitam a ligação do DNA à coluna, seguido pela lavagem e eluição do DNA puro. Este kit foi utilizado em 17 publicações e foi o método que teve maior diversidade de amostras: sangue, escama, tecido, músculo, cordão umbilical, membrana corioalantóide, e coração, mostrando também uma grande versatilidade para diferentes tipos de amostra (QIAGEN. *DNeasy*

Blood & Tissue Handbook. 2020; SHARMA *et al.* 2024; YANG *et al.* 2023). Entretanto, a desvantagem da utilização dessa técnica pode ser o custo, quando comparado aos métodos “*in house*”.

Oito estudos, envolveram o uso do kit DNEasy tissue, que também usa colunas de membrana de sílica (QIAGEN. *DNeasy Tissue Handbook*. 2020). Nestes estudos, as amostras biológicas utilizadas foram: sangue, escama, tecido, músculo, ovo, tecido ósseo, e escama seca (BISHOP *et al.* 2009; HEKKALA *et al.* 2010; HOOG, 2023). A única desvantagem atribuída ao kit é o custo.

Além disso, dois outros kits foram elencados: o kit de extração de DNA PureGene (Minneapolis, MN) e o NucleoSpin kit for DNA extraction (Macherey-Nagel, Düren, Germany), ambos utilizados em 4 publicações. O kit PureGene se utiliza da precipitação seletiva de proteínas no isolamento do DNA em solução, enquanto os kits baseados em coluna de membrana de sílica, o DNA se liga à coluna. As amostras biológicas utilizadas foram: sangue, escama, tecido e músculo (WEAVER *et al.* 2008; QIAGEN. *PureGene DNA Purification Handbook*. 2020; PARKS *et al.* 2023). Já o kit NucleoSpin, segue a mesma base dos outros dois kits já citados acima, utiliza tecnologia de colunas de membrana de sílica, porém só foi usado para extração de DNA de escama (MACHEREY-NAGEL. *NucleoSpin DNA Purification Handbook*. 2021; CASTILLO-RODRÍGUEZ *et al.* 2024). Contudo, pode-se notar que todos os métodos foram eficientes na obtenção de DNA, porém, não é possível afirmar que tais métodos que não utilizaram amostras variadas não sirvam para outros tipos de amostras. São necessários mais estudos que avaliem esses diferentes tipos de amostras.

Várias metodologias foram utilizadas para avaliar a diversidade genética em crocodilianos. Sendo alguns a base de sequenciamento, e outros a base de PCR, podendo estar associados ou não às enzimas de restrição. Contudo, observou-se nos estudos que o sequenciamento foi o método mais comum, presente em 79 publicações. Essa técnica possibilita avaliar diferentes regiões ou fragmentos DNA para inferir diversidade genética (TABORA *et al.* 2012; ROBERTO *et al.* 2020; MILIÁN-GARCÍA *et al.* 2020; AMAVET *et al.* 2023; GVOŽDÍK *et al.* 2024).

O sequenciamento do genoma completo permite ter cobertura total do genoma, com alta resolução, exploração de regiões não codificantes, avalia variações genéticas únicas, possibilitando o rastreamento de declínios históricos e estimativa de tempos de divergência. Entretanto, essa técnica demanda alto custo devido à alta tecnologia, complexidade, demanda computacional alta, foca apenas no genoma nuclear, não leva

em consideração o mtDNA, e assim, não investiga de fato os eventos que ocorreram no passado (YANG *et al.* 2023; GVOŽDÍK *et al.* 2024).

O sequenciamento do mtDNA completo ou de marcadores moleculares, como o citocromo B (CytB), é um marcador versátil, útil para pesquisas filogenéticas, no nível familiar ou abaixo dele, mostrando o porquê esse marcador foi o mais utilizado entre as publicações que utilizaram sequenciamento para a análise da diversidade genética (MEYER, 1994; CASTRESANA, 2001). O uso desse tipo de DNA no sequenciamento fornece uma filogenia de alta resolução, e permite a identificação de possíveis espécies crípticas, possui simplicidade estrutural comparada ao genoma nuclear. Com ele é possível traçar as linhagens maternas e inferir a história evolutiva de fatos que aconteceram no passado, além de ser mais acessível que o sequenciamento genômico, e de possuir várias cópias por célula, facilitando a extração. Porém, usar apenas o mtDNA, sem integração com dados nucleares, limita a inferência sobre a diversidade genética total, pois não é possível inferir a linhagem paterna através dessa região; não detecta variação no DNA nuclear, que pode conter informações importantes sobre adaptação e evolução recente; e o mtDNA, possui baixa taxa de mutação, o que pode dificultar o estudo de variabilidade genética (MEGANATHAN *et al.* 2011; MILIÁN-GARCÍA *et al.* 2018; BITTENCOURT *et al.* 2019; PAN *et al.* 2021; AMAVET *et al.* 2023; VASCONCELOS *et al.* 2024).

O sequenciamento do DNA nuclear não necessariamente precisa ser completo, existe a possibilidade de ser por regiões como dos marcadores moleculares, por exemplo: o C-mos, RAG1, LDH-4, e o complexo MHC. O uso desse tipo de técnica possibilita uma alta resolução na identificação de variantes genéticas, informações relevantes para conservação e seleção genética, identificação de genes sob seleção adaptativa, permitindo investigar eventos que ocorreram recentemente, possui uma maior taxa de mutação, e maior variabilidade, pode ser herdado dos dois progenitores, permitindo uma relação genealógica mais completa comparada a somente ao mtDNA. Entretanto, sem integração com dados mitocondriais pode limitar a inferência sobre a diversidade genética total, não permitindo investigar eventos que ocorreram no passado e possui baixo número de cópias por célula, o que pode dificultar na extração do DNA (JARATLERDSIRI *et al.* 2012; MILIÁN-GARCÍA *et al.* 2020; BARÃO-NÓBREGA 2021).

Seguindo esta linha de pensamento, outros estudos avaliaram sequenciamento de ambas as regiões do DNA, tanto do mtDNA, quanto do DNA nuclear. Esse uso

combinado concedeu uma visão mais completa da diversidade genética, incluindo as contribuições materna e paterna, permitindo investigar tantos eventos recentes (com nDNA) quanto os mais antigos (com mtDNA). A avaliação das divergências entre espécies ou linhagens, facilita a identificação de híbridos em crocodilianos, intercâmbio genético entre populações geograficamente isoladas e o entendimento de padrões de dispersão (via mtDNA) e reprodução local (via nDNA). Contudo, existem diferenças na taxa de evolução, pois a taxa de mutação dos dois é diferente, podendo subestimar ou superestimar as divergências evolutivas. O DNA nuclear apresenta heterozigose de alelos e é possível avaliação de recombinação, exigindo análises mais complexas e requer um maior custo. Enquanto o mtDNA é mais direto por sua transmissão clonal, porém unir esses dois marcadores, demanda bastante tempo e análises minuciosas (HRBEK *et al.* 2008; MEGANATHAN *et al.* 2010; TABORA *et al.* 2012; BORGES *et al.* 2018).

Além disso, alguns estudos combinaram o sequenciamento de regiões do DNA mitocondrial e/ou nuclear, com o sequenciamento de regiões microssatélites do DNA. Quando se fala do sequenciamento das regiões do mtDNA e nDNA as vantagens e desvantagens são as mesmas já citadas, porém com o sequenciamento de microssatélites junto a elas, essas vantagens são ampliadas. Os microssatélites, quando específicos, são altamente polimórficos, oferecem resolução fina para identificar indivíduos, hibridização e gerações subseqüentes, estimam o tamanho efetivo populacional. Contudo, demandam calibração cuidadosa para evitar erros em frequências alélicas; são vulneráveis a artefatos de amplificação; quando não se utiliza microssatélites específicos, há uma grande chance de boa parte não amplificar ou não ser polimórfico, demandando assim alto custo e tempo para desenvolver microssatélites específicos (MILIÁN-GARCÍA *et al.* 2011; AMAVET *et al.* 2017; ZHAI *et al.* 2017; VASHISTHA *et al.* 2020; ARIYARAPHONG *et al.* 2023).

O segundo método com base no sequenciamento foi o sequenciamento ddRAD-seq/DArTseq/sRAD-seq, colocados juntos aqui, porque o princípio é parecido, só muda a quantidade de enzimas de restrição utilizadas. No sRAD-seq usa-se uma única enzima, já o ddRAD-seq e DArTseq usa duas, mas as enzimas do primeiro são escolhidas “manualmente” já o segundo é feito pela empresa “Diversity Arrays Technology”, esse tipo de sequenciamento também se utiliza de marcadores mitocôndrias e marcadores nucleares. As vantagens da utilização do método em si são: alta resolução genética, possibilidade de identificação de milhares de SNPs; é útil para espécies sem genomas

bem caracterizados; versátil, pode ser usada para mapeamento genético, estudos populacionais e análise evolutiva; custo reduzido em comparação ao sequenciamento total do genoma; reprodutibilidade devido à digestão enzimática controlada. Entretanto, possui alto custo, alta demanda computacional; cobertura genômica parcial, apenas regiões próximas aos locais de corte são sequenciadas e é suscetível a viés de seleção de enzimas, pois a escolha das enzimas interfere diretamente na análise dos fragmentos (CHATTOPADHYAY *et al.* 2019; FUKUDA *et al.* 2019; AVILA-CERVANTES *et al.* 2020; LLOYD-JONES *et al.* 2023).

Alguns estudos utilizaram a técnica da PCR para amplificação de microssatélites, proporcionando alta resolução na diferenciação populacional, alta taxa de sucesso na identificação da origem dos indivíduos. Além disso, o uso de microssatélites altamente polimórficos permitiu uma análise detalhada da diversidade genética, permite análise da estrutura genômica e do fluxo gênico. O uso de marcadores altamente informativos, possibilita a identificação de eventos genéticos recentes, podendo ser usados para diversidade genética entre populações, identificação de híbridos, relações de parentesco (paternidade/maternidade) e estrutura populacional. Porém, foca apenas no DNA nuclear, não confirma a pureza dos indivíduos, tem dependência de primers específicos, pois caso os primers não sejam específicos, pode não ser possível detectar os polimorfismos existentes e os processos evolutivos (BISHOP *et al.* 2009; AMAVET *et al.* 2012; QUIRINO *et al.* 2023).

A técnica de ISSR foi utilizada para amplificação de regiões microssatélites. Essa técnica possibilita detectar variações em regiões intergênicas e repetitivas, sendo úteis para detectar polimorfismos em todo o genoma, proporcionando um panorama mais amplo e a genotipagem de organismos sem um genoma de referência. Contudo, dificultam a distinção entre heterozigotos e homozigotos; pode ser menos reprodutivo por ser sensível a pequenas mudanças nas condições da PCR; não são tão úteis para construir filogenias profundas; apesar de mais econômicos, a interpretação demanda mais tempo devido à complexidade do perfil multilocus. (ZIETKIEWICZ, RAFALSKI, & LABUDA, 1994; NIE *et al.* 2012; SHAFIEI-ASTANI *et al.* 2015;).

A PCR-RFLP, mais uma técnica encontrada nesta revisão sistemática, também analisou de regiões do mtDNA ou nDNA. Nesta técnica, foi possível obter uma alta especificidade, dependendo de sítios de restrição analisados; é de baixo custo; pode ser usada em qualquer organismo com genoma conhecido; e identifica substituições nucleotídicas em regiões do mtDNA e DNA nuclear por meio de cortes específicos.

Entretanto, a identificação de novos loci polimórficos exige pré-sequenciamento para mapear regiões candidatas; apenas variações dentro de regiões reconhecidas por endonucleases podem ser detectadas; necessita de digestão enzimática e eletroforese, tornando-a mais trabalhosa do que técnicas diretas de genotipagem, como PCR e sequenciamento e detecta apenas variações associadas a sítios de restrição específicos (BOTSTEIN *et al.* 1980; AGGARWAL *et al.* 1994; MEGANATHAN *et al.* 2009).

Já na técnica RAPD-PCR, utilizaram-se apenas marcadores nucleares, contudo mostrou ser um método rápido e barato; não requer informações prévias sobre a sequência do DNA; é útil para análise de diversidade genética inicial em populações cativas; e tem a capacidade de detectar polimorfismos em genomas grandes. Apesar disso, pequenas variações nas condições da PCR podem alterar os padrões de bandas, deixando esse método com baixa reprodutibilidade, não diferencia indivíduos heterozigotos de homozigotos; é menos informativo do que microssatélites ou SNPs e possui baixa resolução. Entretanto, alguns autores sugeriram o uso de microssatélites e mtDNA para complementar os achados e conferir confiabilidade à pesquisa (Wu *et al.* 2002; Amavet *et al.* 2009).

Por fim, o último método molecular utilizado foi o AFLP-PCR, utilizado em dois estudos, essa técnica permitiu detectar muitos polimorfismos distribuídos ao longo do genoma, incluindo regiões codificantes e não codificantes; é útil para espécies de crocodilianos sem genoma de referência; não necessita de primers específicos; possibilita investigar tanto a diversidade neutra (para medir variabilidade) quanto regiões sob seleção (adaptações ecológicas) e é ideal para amostras históricas ou ambientais. Todavia, dificulta a comparação entre estudos ou laboratórios diferentes; requer bastante tempo laboratorial devido às várias etapas, pois pequenas variações nas condições da PCR podem alterar os padrões de bandas e não distinguem homozigotos de heterozigotos (WANG *et al.* 2006; YAN *et al.* 2006).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, este estudo mostrou a ampla possibilidade de métodos e amostras para se trabalhar com a diversidade genética em crocodilianos, além de reforçar a importância desse grupo e mostrar que ele está nos holofotes da ciência, na temática de diversidade genética. Algumas técnicas já não são tão comuns atualmente, como: AFLP-

PCR, RAPD-PCR e PCR-RFLP, porém todos os métodos têm sua eficiência, vantagens e desvantagens, logo o método ideal vai ser aquele que vai conseguir responder melhor o objetivo de sua pesquisa, combinando quanto tempo disponível para obter os resultados e o tipo de financiamento disponível, unindo esses três pilares, vai ser possível chegar na técnica ideal para cada tipo de pesquisa.

Com isso, a genética da conservação permite caracterizar populações geneticamente distintas, garantindo que os esforços de conservação sejam direcionados de maneira eficiente. A avaliação da diversidade genética também pode contribuir para o desenvolvimento de programas de reprodução em cativeiro, evitando a perda de variabilidade e promovendo a reintrodução de indivíduos em habitats naturais. A aplicação destas técnicas genéticas avançadas permite monitorar o fluxo gênico, detectar possíveis riscos e avaliar o impacto das atividades humanas sobre a diversidade genética do grupo, tornando mais eficaz os programas de manejo e conservação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, R. K., MAJUMDAR, K. C., LANG, J. W., & SINGH, L. (1994). **Generic affinities among crocodylians as revealed by DNA fingerprinting with a Bkm-derived probe.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10601-10605.
- ALARCÓN, L. C. C., & MONTENEGRO, C. B. (2012). **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN EX SITU DECROCODYLUS INTERMEDIUS PRESENTE EN COLOMBIA.** *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36(140), 373-383.
- AMAVET, P. S., ROSSO, E. L., MARKARIANI, R. M., & LARRIERA, A. (2007). **Analysis of the population structure of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) in Santa Fe, Argentina, using the RAPD technique.** *Journal of Herpetology*, 41(2), 294-300.
- AMAVET, P., ROSSO, E., MARKARIANI, R., & PIÑA, C. I. (2008). **Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 637-642.
- AMAVET, P., VILARDI, J. C., ROSSO, E., & SAIDMAN, B. (2009). **Genetic and morphometric variability in *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman), Reptilia, Alligatoridae.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311(4), 258-269.
- AMAVET, P. S., VILARDI, J. C., RUEDA, E. C., LARRIERA, A., & SAIDMAN, B. O. (2012). **Mating system and population analysis of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) using microsatellite markers.** *Amphibia-Reptilia*, 33(1), 83-93.
- AMAVET, P. S., RUEDA, E. C., SIROSKI, P. A., LARRIERA, A., & SAIDMAN, B. O. (2015). **Isolation and characterization of new microsatellite markers for application in population genetic studies of *Caiman latirostris* and related species.** *Amphibia-Reptilia*, 36(2), 175-180.
- AMAVET, P. S., RUEDA, E. C., VILARDI, J. C., SIROSKI, P., LARRIERA, A., & SAIDMAN, B. O. (2017). **The broad-snouted caiman population recovery in Argentina. A case of genetics conservation.** *Amphibia-Reptilia*, 38(4), 411-424.
- AMAVET, P. S., ZUCOLOTO, R. B., HRBEK, T., & FARIAS, I. P. (2021). **Genetic diversity of New World crocodylians.** *Conservation genetics of new world crocodylians*, 123-151.
- AMAVET, P. S., PACHECO-SIERRA, G., UHART, M. M., PRADO, W. S., & SIROSKI, P. A. (2023). **Phylogeographical analysis and phylogenetic inference based on the cytochrome b gene in the genus *Caiman* (Crocodylia: Alligatoridae) in Central and South America.** *Biological Journal of the Linnean Society*, 138(3), 289-303.
- ARIYARAPHONG, N., WONGLOET, W., WATTANADILOKCHATKUN, P., PANTHUM, T., SINGCHAT, W., THONG, T., LISACHOV, A., AHMAD, S. F., MUANGMAI, N., HAN, K., DUENGKAE, P., TEMSIRIPONG, Y. & SRIKULNATH, K. (2023). **Should the identification guidelines for Siamese crocodiles be revised? differing post-occipital scute scale numbers show phenotypic variation does not result from hybridization with saltwater crocodiles.** *Biology*, 12(4), 535.

- AVILA-CERVANTES, J., ARIAS, C., VENEGAS-ANAYA, M., VARGAS, M., LARSSON, H. C., & MCMILLAN, W. O. (2020). **Effect of the Central American Isthmus on gene flow and divergence of the American crocodile (*Crocodylus acutus*)**. *Evolution*, 75(2), 245-259.
- BAIRD, N. A., ETTER, P. D., ATWOOD, T. S., CURREY, M. C., SHIVER, A. L., LEWIS, Z. A., SELKER, E. U., CRESKO, W. A. & JOHNSON, E. A. (2008). **Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers**. *PloS one*, 3(10), e3376.
- BALAGUERA-REINA, S. A., MONCADA-JIMENEZ, J. F., PRADA-QUIROGA, C. F., HERNANDEZ-GONZALEZ, F., BOLAÑOS-CUBILLOS, N. W., FARFÁN-ARDILA, N., GARCIA-CALDERÓN, L. M. & DENSMORE III, L. D. (2020). **Tracking a voyager: mitochondrial DNA analyses reveal mainland-to-island dispersal of an American crocodile (*Crocodylus acutus*) across the Caribbean**. *Biological Journal of the Linnean Society*, 131(3), 647-655.
- BALAGUERA-REINA, S. A.; VARGAS-RAMÍREZ, M.; ORDÓÑEZ-GARZA, N.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F.; DENSMORE, L. D. **Unveiling the mystery: assessing the evolutionary trajectory of the Apaporis caiman population (*Caiman crocodilus apaporiensis*, Medem 1955) via mitochondrial molecular makers**. (2020) *Biological Journal of Linnean Society*. <https://doi.org/10.1093/biolinnea/blaa096>.
- BALAGUERA-REINA, S. A., KONVALINA, J. D., MOHAMMED, R. S., GROSS, B., VAZQUEZ, R., MONCADA, J. F., ALI, S., HOFFMAN, E. A. & DENSMORE III, L. D. (2021). **From the river to the ocean: mitochondrial DNA analyses provide evidence of spectacled caimans (*Caiman crocodilus* Linnaeus 1758) mainland–insular dispersal**. *Biological Journal of the Linnean Society*, 134(2), 486-497.
- BALAGUERA-REINA, S. A., ANGULO-BEDOYA, M., MONCADA-JIMENEZ, J. F., WEBSTER, M., ROBERTO, I. J., & MAZZOTTI, F. J. (2022). **Update: Assessing the evolutionary trajectory of the Apaporis caiman (*Caiman crocodilus apaporiensis*, Medem 1955) via mitochondrial molecular markers**. *Biological Journal of the Linnean Society*, 137(4), 700-710.
- BARÃO-NÓBREGA, J. A. L. (2021). **Habitat and population structure of the Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Calakmul Biosphere Reserve, Campeche, Mexico** (Doctoral dissertation).
- BASHYAL, A. (2012). **Population genetics of the American crocodile in Coiba National Park, Panama** (Doctoral dissertation).
- BASHYAL, A., GROSS, B. A., VENEGAS-ANAYA, M. D., LOWRANCE, F., & DENSMORE III, L. D. (2014). **Assessment of microsatellites in estimating inter-and intraspecific variation among Neotropical *Crocodylus* species**. *Genetics and Molecular Research*.
- BLEARS, M. J., DE GRANDIS, S. A., LEE, H., & TREVORS, J. T. (1998). **Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications**. *Journal of Industrial microbiology and Biotechnology*, 21(3), 99-114.
- BISHOP, J. M., LESLIE, A. J., BOURQUIN, S. L., & O'RYAN, C. (2009). **Reduced effective population size in an overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*)**. *Biological Conservation*, 142(10), 2335-2341.
- BITTENCOURT, P. S.; CAMPOS, Z.; MUNIZ, F. L.; MARIONI, B.; SOUZA, B. C.; DA SILVEIRA, R.; DE THOISY, B.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. (2019). **Evidence of cryptic**

lineages within a small South American crocodylian: the Schneider's Dwarf caiman *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae). PeerJ, v. 7, e6580. Disponível em <https://doi.org/10.7717/peerj.6580>.

BLOOR, P., IBÁÑEZ, C., & VILORIA-LAGARES, T. A. (2015). **Mitochondrial DNA analysis reveals hidden genetic diversity in captive populations of the threatened American crocodile (*Crocodylus acutus*) in Colombia.** *Ecology and Evolution*, 5(1), 130-140.

BORGES, V. S., SANTIAGO, P. C., LIMA, N. G., COUTINHO, M. E., ETEROVICK, P. C., & CARVALHO, D. C. (2018). **Evolutionary significant units within populations of Neotropical broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*, Daudin, 1802).** *Journal of Herpetology*, 52(3), 282-288.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., & DAVIS, R. W. (1980). **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.** *American journal of human genetics*, 32(3), 314.

BROWN, T. A. **Southern blotting and related DNA detection techniques.** *DNA*, v. 1, n. 2, p. 3, 2001.

CAMPOS, J. C., MOBARAKI, A., ABTIN, E., GODINHO, R., & BRITO, J. C. (2018). **Preliminary assessment of genetic diversity and population connectivity of the Mugger Crocodile in Iran.** *Amphibia-Reptilia*, 39(1), 126-131.

CASTILLO-RODRÍGUEZ, N., SALDARRIAGA-GÓMEZ, A. M., ANTELO, R., & VARGAS-RAMÍREZ, M. (2024). **First genetic evaluation of a wild population of *Crocodylus intermedius*: New insights for the recovery of a Critically Endangered species.** *Plos one*, 19(10), e0311412.

CASTRESANA, J. 2001. **Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals.** *Molecular Biology and Evolution* 18(4):465-471

CAO, R., SOMAWEERA, R., BRITAIN, K., FITZSIMMONS, N. N., GEORGES, A., & GONGORA, J. (2020). **Genetic structure and diversity of Australian freshwater crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) from the Kimberley, Western Australia.** *Conservation Genetics*, 21, 421-429.

CHAEYCHOMSRI, W., CHAEYCHOMSRI, S., TUNTIRUNGKIJ, M., TABTHIPWON, P., NOPARATNARAPORN, N., & SIRIPHOLVAT, V. (2008). **Characterization of microsatellite markers for the siamese crocodile and amplification in the closely related genus *Crocodylus*.** *Agriculture and Natural Resources*, 42(4), 682-692.

CHATTOPADHYAY, B., GARG, K. M., SOO, Y. J., LOW, G. W., FRECHETTE, J. L., & RHEINDT, F. E. (2019). **Conservation genomics in the fight to help the recovery of the critically endangered Siamese crocodile *Crocodylus siamensis*.** *Molecular Ecology*, 28(5), 936-950.

CHONG L.K., TAN S.G., YUSOFF K., SIRAJ S.S. (2000) **Identification and characterization of Malaysian river catfish, *Mystus nemurus* (C&V): RAPD and AFLP analysis.** *Biochem Genet* 38:63–76

CUNNINGHAM, S. W., SHIRLEY, M. H., & HEKKALA, E. R. (2016). **Fine scale patterns of genetic partitioning in the rediscovered African crocodile, *Crocodylus suchus* (Saint-Hilaire 1807).** PeerJ, 4, e1901.

- DAVIS, L. M., GLENN, T. C., STRICKLAND, D. C., GUILLETTE JR, L. J., ELSEY, R. M., RHODES, W. E., DESSAUER, H., C., & SAWYER, R. H. (2002). **Microsatellite DNA analyses support an east-west phylogeographic split of American alligator populations.** *Journal of Experimental Zoology*, 294(4), 352-372.
- DE THOISY, B., HRBEK, T., FARIAS, I. P., VASCONCELOS, W. R., & LAVERGNE, A. (2006). **Genetic structure, population dynamics, and conservation of black caiman (*Melanosuchus niger*).** *Biological Conservation*, 133(4), 474-482.
- DEVER, J. A., & DENSMORE, L. D. (2001). **Microsatellites in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) and their utility in addressing crocodylian population genetics questions.** *Journal of Herpetology*, 35(3), 541-544.
- DEVER, J. A., STRAUSS, R. E., RAINWATER, T. R., MCMURRY, S. T., & DENSMORE III, L. D. (2002). **Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America.** *Copeia*, 2002(4), 1078-1091.
- DÍAZ-MORENO, D. M., HERNÁNDEZ-GONZALEZ, F., MONCADA-JIMENEZ, J. F., MORA, C., PRADA, C., JIMÉNEZ-ALONSO, G., & BALAGUERA-REINA, S. A. (2021). **Molecular characterization of the spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) in the upper Magdalena River basin, Colombia: demographic and phylogeographic insights.** *Systematics and Biodiversity*, 19(8), 1040-1048.
- DOYLE, J. J., & DOYLE, J. L. (1987). **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- DOS SANTOS, R. L., MARIZ JR, C. F., MASCARENHAS-JÚNIOR, P. B., BARBOZA, R. S. L., DOS SANTOS, E. M., SOUSA CORREIA, J. M., & CARVALHO, P. S. M. (2024). **Nondestructive Evaluation of Metal Bioaccumulation and Biochemical Biomarkers in Blood of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) from Northeastern Brasil.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(4), 878-895.
- DOS SANTOS, R. L., DE SOUSA CORREIA, J. M., & DOS SANTOS, E. M. (2021). **Freshwater aquatic reptiles (Testudines and Crocodylia) as biomonitor models in assessing environmental contamination by inorganic elements and the main analytical techniques used: a review.** *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 1-23.
- EATON, M. J., MARTIN, A., THORBJARNARSON, J., & AMATO, G. (2009). **Species-level diversification of African dwarf crocodiles (Genus *Osteolaemus*): a geographic and phylogenetic perspective.** *Molecular phylogenetics and evolution*, 50(3), 496-506.
- EATON, M.J. (2010). **Dwarf Crocodile *Osteolaemus tetraspis*.** Pp. 127-132 in *Crocodyles. Status Survey and Conservation Action Plan. Third Edition.* Crocodile Specialist Group: Darwin.
- FALEIRO, G. F.; OLIVEIRA J. S.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, R. S. **Banco de Germoplasma de *Passiflora L.* 'Flor da Paixão' no portal Alelo Recursos Genéticos.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2019.
- FARIAS, I. P., DA SILVEIRA, R., DE THOISY, B., MONJELÓ, L. A., THORBJARNARSON, J., & HRBEK, T. (2004, August). **Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodylians.** In *Animal Conservation Forum* (Vol. 7, No. 3, pp. 265-272). Cambridge University Press.

- FARIAS, I. P.; ROBERTO, I. J.; MUNIZ, F.; HERNÁNDEZ-RANGEL, S. M.; BITTENCOURT, P. S. T.; CAMPOS, Z. & HRBEK, T. **Genética da conservação dos crocodilianos no Brasil**. Tratado de Crocodilianos, Instituto Marcos Daniel, 2021. Cap 23, Pp 590 -621
- FENG, G., WU, X., YAN, P., & LI, X. (2010). **Two complete mitochondrial genomes of *Crocodylus* and implications for crocodilians phylogeny**. *Amphibia-reptilia*, 31(3), 299-309.
- FIGUEIREDO, R. G. **A história dos jacarés e seus ancestrais**. In: MERÇON, L; SANTOS, M. R.; NÓBREGA, Y. *Marginais: jacarés da Mata Atlântica*. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2019. p. 30-35.
- FITZSIMMONS, N. N., TANKSLEY, S. U. S. A. N., FORSTNER, M. R., LOUIS, E. E., DAGLISH, R., GRATTON, J. A. C. O. B., & DAVIS, S. C. O. T. T. (2001). **Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics**. *Crocodylian biology and evolution*, 51-57.
- FUKUDA, Y., WEBB, G., MANOLIS, C., LINDNER, G., & BANKS, S. (2019). **Translocation, genetic structure and homing ability confirm geographic barriers disrupt saltwater crocodile movement and dispersal**. *PloS one*, 14(8), e0205862.
- GHOSH, A., JOHNSON, M. G., OSMANSKI, A. B., LOUHA, S., BAYONA-VÁSQUEZ, N. J., GLENN, T. C., GONGORA, J., GREEN, R. E., ISBERG, S., STEVENS, R. D. & RAY, D. A. (2020). **A high-quality reference genome assembly of the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*, reveals patterns of selection in Crocodylidae**. *Genome Biology and Evolution*, 12(1), 3635-3646.
- GLENN, T. C., STEPHAN, W., DESSAUER, H. C., & BRAUN, M. J. (1996). **Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability**. *Molecular Biology and Evolution*.
- GLENN, T. C., STATON, J. L., VU, A. T., DAVIS, L. M., BREMER, J. R. A., RHODES, W. E., BRISBIN, I. L. & SAWYER, R. H. (2002). **Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in crocodilians**. *Journal of Experimental Zoology*, 294(4), 312-324.
- GVOŽDÍK, V., DOLINAY, M., ZASSI-BOULOU, A. G., LEMMON, A. R., LEMMON, E. M., & PROCHÁZKA, M. (2024). **Central African dwarf crocodiles found in syntopy are comparably divergent to South American dwarf caimans**. *Biology Letters*, 20(5), 20230448.
- GODSHALK, R. E. (2006). **Phylogeography and conservation genetics of the yacare caiman (*Caiman yacare*) of South America**. University of Florida.
- GONZÁLEZ-TRUJILLO, R., RODRIGUEZ, D., GONZÁLEZ-ROMERO, A., FORSTNER, M. R., DENSMORE III, L. D., & REYNOSO, V. H. (2012). **Testing for hybridization and assessing genetic diversity in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) populations from central Veracruz**. *Conservation Genetics*, 13, 1677-1683.
- GREEN, M. R., & SAMBROOK, J. (2019). **Polymerase chain reaction**. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb-top095109.
- GREGORIUS, H. R. (1978). **The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance**. *Mathematical Biosciences*, 41(3-4), 253-271.

- GRIGG, G.; KIRSHNER, D. **Biology and evolution of crocodylians**. Nova York: Comstock Publishing, 2015. 672p.
- HASSAN, R.; AZIZI, N. F. M.; ADZHAR, M. A. A. M.; GANI, M. I. Z. A.; AHMAD, R. & UNG, C. L. M. (2018). **A taphonomic study of *Crocodylus porosus* (crocodylidae) and *Tomistoma schlegelii* (gavialidae) remains from western Sarawak, Malaysian Borneo: Applications for public education**. *Trends in Undergraduate Research*, 1(1), a23-32.
- HADRY S H, BALICK M, SCHIERWATER B. **Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology**. *Molecular Ecology* 1: 55–63. 1992.
- HERNÁNDEZ-RANGEL, S. M., MORALES-BETANCOURT, M. A., MUNIZ, F. L., VARGAS-RAMÍREZ, M., ROJAS-RUNJAIC, F. J., LASSO, C. A., & CABALLERO, S. (2024). **Phylogenetic identity and population structure of the dwarf caimans *Paleosuchus* spp. in the Orinoco basin of Colombia and Venezuela: filling gaps**. *Biological Journal of the Linnean Society*, 142(1), 68-80.
- HEKKALA, E. R., AMATO, G., DESALLE, R., & BLUM, M. J. (2010). **Molecular assessment of population differentiation and individual assignment potential of Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) populations**. *Conservation Genetics*, 11, 1435-1443.
- HEKKALA, E.; SHIRLEY, M.H.; AMATO, G.; AUSTIN, J.D.; CHARTER, S.; THORBJARNARSON, J.; VLIET, K.A.; HOUCK, M.L.; DESALLE, R.; BLUM, M.J. (2011). **An ancient icon reveals new mysteries: mummy DNA resurrects a cryptic species within the Nile crocodile**. *Molecular Ecology* 20: 4195-4215
- HEKKALA, E. R., PLATT, S. G., THORBJARNARSON, J. B., RAINWATER, T. R., TESSLER, M., CUNNINGHAM, S. W., TWOMEY, C. & AMATO, G. (2015). **Integrating molecular, phenotypic and environmental data to elucidate patterns of crocodile hybridization in Belize**. *Royal Society Open Science*, 2(9), 150409.
- HINLO, M. R. P., TABORA, J. A., BAILEY, C. A., TREWICK, S., REBONG, G., WEERD, M. V., POMARES, C. C., ENGBERG, S., E., BRENNEMAN, R. A. & LOUIS JR, E. E. (2014). **Population genetics implications for the conservation of the Philippine Crocodile *Crocodylus mindorensis* Schmidt, 1935 (Crocodylia: Crocodylidae)**. *Journal of Threatened Taxa*, 6(3), 5513-5533.
- HOOG, M. (2023). **The Effect of Genetic Relatedness on Mate Selection and Spatial Distribution in the American Alligator, *Alligator mississippiensis***.
- HRBEK, T., VASCONCELOS, W. R., REBELO, G., & FARIAS, I. P. (2008). **Phylogenetic relationships of South American alligatorids and the Caiman of Madeira River**. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 588-599.
- IUCN RED LIST - <https://www.iucnredlist.org/species/5659/212805700> - Data de acesso: 29/02/2025 14:49
- JARATLERDSIRI, W., ISBERG, S. R., HIGGINS, D. P., & GONGORA, J. (2012). **MHC class I of saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*): polymorphism and balancing selection**. *Immunogenetics*, 64, 825-838.
- JOGAYYA, K. N., MEGANATHAN, P. R., DUBEY, B., & HAQUE, I. (2013). **Novel microsatellite DNA markers for Indian Gharial (*Gavialis gangeticus*)**. *Conservation Genetics Resources*, 5(3), 787-790.

- JOSHI, M., & DESHPANDE, J. D. (2010). **Polymerase chain reaction: methods, principles and application**. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
- KAUR, T., & ONG, A. H. K. (2011). **Heteroplasmy, length, and sequence characterization of the mitochondrial control region in *Tomistoma schlegelii***. *Biochemical genetics*, 49, 562-575.
- KAUR, T., JAPNING, J. R. R., SABKI, M. S., SIDIK, I., CHONG, L. K., & ONG, A. H. (2013). **Genetic diversity of *Tomistoma schlegelii* inferred from mtDNA markers**. *Biochemical genetics*, 51, 275-295.
- LAPBENJAKUL, S., THAPANA, W., TWILPRAWAT, P., MUANGMAI, N., KANCHANAKETU, T., TEMSIRIPONG, Y., UNAJAK, S., PEYACHOKNAGUL, S. & SRIKULNATH, K. (2017). **High genetic diversity and demographic history of captive Siamese and Saltwater crocodiles suggest the first step toward the establishment of a breeding and reintroduction program in Thailand**. *PLoS One*, 12(9), e0184526.
- LI, Y., WU, X., JI, X., YAN, P., & AMATO, G. (2007). **The complete mitochondrial genome of salt-water crocodile (*Crocodylus porosus*) and phylogeny of crocodylians**. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(2), 119-128.
- LIU, H., WU, X., YAN, P., & JIANG, Z. (2007). **Polymorphism of exon 3 of MHC class II B gene in Chinese alligator (*Alligator sinensis*)**. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(10), 918-929.
- LLOYD-JONES, L. R., BRIEN, M. L., FEUTRY, P., LAWRENCE, E., BERI, P., BOOTH, S., COULSON, S., BAYLIS, S. M., VILLIERS, K., TAPLIN, L. E. & WESTCOTT, D. A. (2023). **Implications of past and present genetic connectivity for management of the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*)**. *Evolutionary Applications*, 16(4), 911-935.
- LUCK, N. L., THOMAS, K. C., MORIN-ADELIN, V. E., BARWICK, S., CHONG, A. Y., CARPENTER, E. L., ... & GONGORA, J. (2012). **Mitochondrial DNA analyses of the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) from the Northern Territory of Australia**. *Australian Journal of Zoology*, 60(1), 18-25.
- MACHEREY-NAGEL. *NucleoSpin DNA Purification Handbook*. Düren, Germany: Macherey-Nagel, 2021. Disponível em: www.mn-net.com.
- MACHKOUR-M'RABET, S., HÉNAUT, Y., CHARRUAU, P., GEVREY, M., WINTERTON, P., & LEGAL, L. (2009). **Between introgression events and fragmentation, islands are the last refuge for the American crocodile in Caribbean Mexico**. *Marine Biology*, 156, 1321-1333.
- MAN, Z., YISHU, W., PENG, Y., & XIAOBING, W. (2011). **Crocodylian phylogeny inferred from twelve mitochondrial protein-coding genes, with new complete mitochondrial genomic sequences for *Crocodylus acutus* and *Crocodylus novaeguineae***. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(1), 62-67.
- MAUGER, L. A., VELEZ, E., CHERKISS, M. S., BRIEN, M. L., MAZZOTTI, F. J., & SPOTILA, J. R. (2017). **Conservation genetics of American crocodile, *Crocodylus acutus*, populations in Pacific Costa Rica**. *Nature Conservation*, 17, 1-17.
- MAZZOTTI, F. J., BEST, G. R., BRANDT, L. A., CHERKISS, M. S., JEFFERY, B. M., RICE, K. G. (2009). **Alligators and crocodiles as indicators for restoration of Everglades ecosystems**. *Ecological indicators*, 9(6), S137-S149.

- MD ADZHAR, M. A. A., & HASSAN, R. (2017). **Relationships among Tomistoma schlegelii in Malaysia Based on Cyt b-Control Region Gene Analysis.** *International Journal of Zoology*, 2017(1), 5431041.
- MEGANATHAN, P. R., DUBEY, B., & HAQUE, I. (2009). **Molecular identification of Indian crocodile species: PCR-RFLP method for forensic authentication.** *Journal of forensic sciences*, 54(5), 1042-1045.
- MEGANATHAN, P. R., DUBEY, B., BATZER, M. A., RAY, D. A., & HAQUE, I. (2010). **Molecular phylogenetic analyses of genus Crocodylus (Eusuchia, Crocodylia, Crocodylidae) and the taxonomic position of Crocodylus porosus.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(1), 393-402.
- MEGANATHAN, P. R., DUBEY, B., BATZER, M. A., RAY, D. A., & HAQUE, I. (2011). **Complete mitochondrial genome sequences of three Crocodylus species and their comparison within the Order Crocodylia.** *Gene*, 478(1-2), 35-41.
- MEGANATHAN, P. R., DUBEY, B., JOGAYYA, K. N., & HAQUE, I. (2013). **Identification of Indian crocodile species through DNA barcodes.** *Journal of forensic sciences*, 58(4), 993-998.
- MEREDITH, R. W., HEKKALA, E. R., AMATO, G., & GATESY, J. (2011). **A phylogenetic hypothesis for Crocodylus (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World.** *Molecular phylogenetics and evolution*, 60(1), 183-191.
- MEYER, A. 1994. **Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker.** *Trends in Ecology & Evolution* 9(8):278-280
- MILIÁN-GARCÍA, Y., VENEGAS-ANAYA, M., FRIAS-SOLER, R., CRAWFORD, A. J., RAMOS-TARGARONA, R., RODRÍGUEZ-SOBERÓN, R., ALONSO-TABET, M., THORBJARNARSON, J., SANJUR, O., I., ESPINOSA-LÓPEZ, G. & BERMINGHAM, E. (2011). **Evolutionary history of Cuban crocodiles Crocodylus rhombifer and Crocodylus acutus inferred from multilocus markers.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315(6), 358-375.
- MILIÁN-GARCÍA, Y., RAMOS-TARGARONA, R., PÉREZ-FLEITAS, E., SOSA-RODRÍGUEZ, G., GUERRA-MANCHENA, L., ALONSO-TABET, M., ESPINOSA-LÓPEZ, G. & RUSSELLO, M. A. (2015). **Genetic evidence of hybridization between the critically endangered Cuban crocodile and the American crocodile: implications for population history and in situ/ex situ conservation.** *Heredity*, 114(3), 272-280.
- MILIÁN-GARCÍA, Y., CASTELLANOS-LABARCENA, J., RUSSELLO, M. A., & AMATO, G. (2017). **Mitogenomic investigation reveals a cryptic lineage of Crocodylus in Cuba.** *Bulletin of Marine Science*, 94(2), 329-343.
- MILIÁN-GARCÍA, Y., RUSSELLO, M. A., CASTELLANOS-LABARCENA, J., CICHON, M., KUMAR, V., ESPINOSA, G., ROSSI, N., MAZZOTTI, F., HEKKALA, E., AMATO, G. & JANKE, A. (2018). **Genetic evidence supports a distinct lineage of American crocodile (Crocodylus acutus) in the Greater Antilles.** *PeerJ*, 6, e5836.
- MILIÁN-GARCÍA, Y., AMATO, G., GATESY, J., HEKKALA, E., ROSSI, N., & RUSSELLO, M. (2020). **Phylogenomics reveals novel relationships among Neotropical crocodiles (Crocodylus spp.).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 152, 106924.

- MOBARAKI, A., FITZSIMMONS, N. N., & ABTIN, E. (2014). **Mugger Crocodiles (*Crocodylus palustris*) in Iran: a preliminary genetic study**. Crocodile specialist Group newsletter, 33(4).
- MONCADA-JIMENEZ, J. F., HERNANDEZ-GONZALEZ, F., PRADA-QUIROGA, C. F., GARCÍA-CALDERON, L. M., GARCÍA, Y., HERNANDEZ, E., LOPEZ, A., ARGEL, A., POLO, J. M., FARFAN-ARDILA, N. & BALAGUERA-REINA, S. A. (2023). **Phylogeography of the American crocodile, *Crocodylus acutus* (Crocodylia: Crocodylidae) in Colombia: a conservation perspective**. *Biological Journal of the Linnean Society*, 140(4), 606-620.
- MUKHOPADHYAY, T., & BHATTACHARJEE, S. (2016). **Genetic diversity: Importance and measurements**. *Conserving biological diversity: A multiscaled approach*. New Delhi, India: Research India Publications, 251-295.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., & ERLICH, H. (1986, January). **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MUNIZ, F. D. L. (2012). **Filogeografia e genética de populações de jacaré-paguá (*Paleosuchus palpebrosus*) ao longo do rio Madeira e bacia do rio Paraguai (Pantanal)**.
- MUNIZ, F. D. L., CAMPOS, Z., HERNÁNDEZ RANGEL, S. M., MARTÍNEZ, J. G., SOUZA, B. C., DE THOISY, B., BOTERO-ARIAS, R., HRBEK, T. & FARIAS, I. P. (2018). **Delimitation of evolutionary units in Cuvier's dwarf caiman, *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807): insights from conservation of a broadly distributed species**. *Conservation genetics*, 19, 599-610.
- MUNIZ, F. L., XIMENES, A. M., BITTENCOURT, P. S., HERNÁNDEZ-RANGEL, S. M., CAMPOS, Z., HRBEK, T., & FARIAS, I. P. (2019). **Detecting population structure of *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae) through microsatellites markers developed by next generation sequencing**. *Molecular Biology Reports*, 46(2), 2473-2484.
- MURILLO, L. P. P., MONTERO, J. R. B. & BARR, B. R. (2008). **Variación genética y flujo de genes entre poblaciones de *Crocodylus acutus* (Crocodylia: Crocodylidae) en tres ríos del Pacífico Central, Costa Rica**. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 1471-1480.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.
- NADARAJAN, R., HASSAN R., GANI, M. I. Z. A., HASSAN, M. A., AHMAD, R., & KETOL, B. (2022). **Genetic Analysis of Saltwater Crocodile (*Crocodylus porosus*) from Sarawak River Basin, Sarawak using Cytochrome Oxidase I and Cytochrome b Gene Analysis**. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(1), 80-88.
- NIE, C., WU, X., LI, Y., & ZHAO, J. (2012). ISSR markers as a tool for assessing genetic diversity in the Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *收藏*, 4.
- NIE, C., ZHAO, J., LI, Y., & WU, X. (2013). **Diversity and selection of MHC class IIb gene exon3 in Chinese alligator**. *Molecular biology reports*, 40, 295-301.

- NIE, C., LI, Y., ZHAO, J., & WU, X. (2014). **Extremely high major histocompatibility complex class IIb gene intron 2 variation and population structure in Chinese alligator.** *Journal of genetics*, 93, 86-91.
- NGUYEN, T. T., ZIEGLER, T., RAUHAUS, A., NGUYEN, T. Q., TRAN, D. T. A., WAYAKONE, S., ... & LE, M. D. (2018). **Genetic screening of Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*) in Laos and Vietnam: Identifying purebred individuals for conservation and release programs.** *Crocodile Specialist Group Newsl*, 37, 8-14.
- OLIVEIRA, T. G. M. de. **Aplicação do sequenciamento de nova geração no diagnóstico molecular de cardiomiopatia hipertrófica.** 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, V. C. S. **Evolução cromossômica em crocodylia (Animalia, Reptilia).** 2024.
- PACHECO-SIERRA, G., GOMPERT, Z., DOMÍNGUEZ-LASO, J., & VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E. (2016). **Genetic and morphological evidence of a geographically widespread hybrid zone between two crocodile species, *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii*.** *Molecular Ecology*, 25(14), 3484-3498.
- PAIVA, S. R. (Ed. Técnico); ALBUQUERQUE, M. S. M. (Ed. Técnico); SALOMÃO, A. N. (Ed. Técnico); JOSÉ, S. C. B. R. (Ed. Técnico); MOREIRA, J. R. (Ed. Técnico). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Brasília, DF: Embrapa, 2019. 300 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).
- PAN, T., WANG, H., DUAN, S., ALI, I., YAN, P., CAI, R., WANG, M., ZHANG, J., ZHANG, H., ZHANG, B. & WU, X. (2019). **Historical population decline and habitat loss in a critically endangered species, the Chinese alligator (*Alligator sinensis*).** *Global Ecology and Conservation*, 20, e00692.
- PAN, T., MIAO, J. S., ZHANG, H. B., YAN, P., LEE, P. S., JIANG, X. Y., OUYANG, JH., DENG, YP., ZHANG, BW. & WU, X. B. (2021). **Near-complete phylogeny of extant Crocodylia (Reptilia) using mitogenome-based data.** *Zoological Journal of the Linnean Society*, 191(4), 1075-1089.
- PALUMBI S.R. (1996). **Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction.** In: **Molecular Systematics.** 2nd edn. (Hillis DM, Moritz C and Mable BK, eds.). Sinauer Associates, Sunderland.
- PAREEK, C. S.; SMO CZYNSKI, R. I.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of applied genetics**, v. 52, p. 413-435, 2011.
- PARKS, A. J., GODFREY, S. T., GROSS, B. A., BALAGUERA-REINA, S. A., SMITH, N. G., MAZZOTTI, F. J., & DENSMORE III, L. D. (2023). **Not one but two: examining the genetic origin and characterization of the non-native spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) in Florida.** *Biological Invasions*, 26(3), 779-795.
- PATWARDHAN, A., RAY, S., & ROY, A. (2014). **Molecular markers in phylogenetic studies-a review.** *Journal of phylogenetics & evolutionary biology*, 2(2), 131.
- PIERCE, B. A. **Genética - Um Enfoque Conceitual, 5ª edição.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. Cap 19.
- POSSO-PELAEZ, C., IBANEZ, C., & BLOOR, P. (2018). **Low mitochondrial DNA variability in the captive breeding population of the critically endangered Orinoco**

crocodile (*Crocodylus intermedius*) from Colombia. *Herpetological Conservation and Biology*, 13(2), 347-354.

QIAGEN. *DNeasy Blood & Tissue Handbook*. Hilden, Germany: Qiagen, 2020. Disponível em: www.qiagen.com.

QIAGEN. *DNeasy Tissue Handbook*. Hilden, Germany: Qiagen, 2020.

QIAGEN. *PureGene DNA Purification Handbook*. Hilden, Germany: Qiagen, 2020. Disponível em: www.qiagen.com.

QUIRINO, W., VARGAS, S. M., ORNELAS, I. S., ALVARENGA, F. P., DIAS, G. G., SILVA, B. N. M., & NÓBREGA, Y. C. **REVISITANDO A DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE CAIMAN LATIROSTRIS (ALLIGATORIDAE: CROCODYLIA) NO BRASIL REVISITING THE DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF *Caiman latirostris* (ALLIGATORIDAE: CROCODYLIA) IN BRAZIL.** *FAESA*, Vitória, ES, v.19, n.1, p.104-124, 2023

RAY, D. A., & DENSMORE, L. D. (2003). **Repetitive sequences in the crocodilian mitochondrial control region: poly-A sequences and heteroplasmic tandem repeats.** *Molecular Biology and Evolution*, 20(6), 1006-1013.

RAY, D. A., DEVER, J. A., PLATT, S. G., RAINWATER, T. R., FINGER, A. G., MCMURRY, S. T., BATZER, M. A., BARR, B., STAFFORD, P. J., MCKNIGHT, J. & DENSMORE, L. D. (2004). **Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*.** *Conservation Genetics*, 5, 449-462.

RIFF, D.; SOUZA, R. G.; CIDADE, G. M.; MARTINELLI, A. G.; SOUZA-FILHO, J. D. 2012. **Crocodilomorfos: a maior diversidade de répteis fósseis do Brasil.** *Terræ*, 9(1/2), 12-40.

ROBERTO, I. J.; BITTENCOURT, P. S.; MUNIZ, F. L.; HERNÁNDEZ-RANGEL, S. M.; NÓBREGA, Y. C.; ÁVILA, R. W.; SOUZA, B. C.; ALVAREZ, G.; MIRANDA-CHUMACERO, G.; CAMPOS, Z.; FARIAS, I. P.; HRBEK T. **Unexpected but unsurprising lineage diversity within the most widespread Neotropical crocodilian genus *Caiman* (*Crocodylia*, *Alligatoridae*).** *Systematics and Biodiversity*, v. 18, n. 4, p. 377-395, 2020.

ROBERTO, I. J.; BITTENCOURT, P. S.; HERNÁNDEZ-RANGEL, S. M. **Taxonomia e biologia geral dos crocodilianos do Brasil.** *Tratado de Crocodilianos do Brasil*, p. 60-93, 2021.

ROBERTO, I. J., FEDLER, M. T., HRBEK, T., FARIAS, I. P., & BLACKBURN, D. C. (2021). **The taxonomic status of Florida Caiman: a molecular reappraisal.** *Journal of Herpetology*, 55(3), 279-284.

ROCHFORD, M. R., KRYSKO, K. L., MAZZOTTI, F. J., SHIRLEY, M. W., PARRY, M. W., WASILEWSKI, J. A., BEAUCHAMP, J. S., GILLETTE, C. R., METZGER III, E. F., SQUIRES, M. A. & SOMMA, L. A. (2016). **Molecular Analysis Confirming the Introduction of Nile Crocodiles, *Crocodylus niloticus* Laurenti 1768 (*Crocodylidae*), in Southern Florida, with an Assessment of Potential for Establishment, Spread, and Impacts.**

RODRIGUEZ, D., CEDEÑO-VÁZQUEZ, J. R., FORSTNER, M. R., & DENSMORE III, L. D. (2008). **Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: II. Evidence from microsatellites.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 674-686.

- ROSSI, N. A., MENCHACA-RODRIGUEZ, A., ANTELO, R., WILSON, B., MCLAREN, K., MAZZOTTI, F., CRESPO, R., WASILEWSKI, J., ALDA, F., DOADRIO, I., BARROS, T. R., HEKKALA, E., ALONSO-TABET, M., ALONSO-GIMÉNEZ, Y., LOPEZ, M., ESPINOSA-LOPEZ, G., BURGESS, J., THORBJARNARSON, J. B., GINSBERG, J. R., VLIET, K. A. & AMATO, G. (2020). **High levels of population genetic differentiation in the American crocodile (*Crocodylus acutus*)**. *PLoS One*, 15(7), e0235288.
- RUSSELLO, M. A., BRAZAITIS, P., GRATTEN, J., WATKINS-COLWELL, G. J., & CACCONI, A. (2006). **Molecular assessment of the genetic integrity, distinctiveness and phylogeographic context of the Saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) on Palau**. *Conservation Genetics*, 8, 777-787.
- RYBERG, W. A., FITZGERALD, L. A., HONEYCUTT, R. L., & CATHEY, J. C. (2002). **Genetic relationships of American alligator populations distributed across different ecological and geographic scales**. *Journal of Experimental Zoology*, 294(4), 325-333.
- SALDARRIAGA-GÓMEZ, A. M., ARDILA-ROBAYO, M. C., MEDEM, F., & VARGAS-RAMÍREZ, M. (2023). **Hope is the last thing lost: Colombian captive-bred population of the critically endangered Orinoco crocodile (*Crocodylus intermedius*) is a genetic reservoir that could help to save the species from extinction**. *Nature Conservation*, 53, 85-103.
- SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. **Molecular cloning: a Laboratory manual**, 3. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977). **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- SAUNDERS, D. A. **Biological consequences of ecosystem fragmentation**. *Conser Biol*, v. 5, p. 32-81, 1991.
- SCHMITZ, A., MANSFELD, P., HEKKALA, E., SHINE, T., NICKEL, H., AMATO, G., & BÖHME, W. (2003). **Molecular evidence for species level divergence in African Nile crocodiles *Crocodylus niloticus* (Laurenti, 1786)**. *Comptes Rendus Palevol*, 2(8), 703-712.
- SERNA-LAGUNES, R., GONZÁLEZ, D., & DÍAZ-RIVERA, P. (2012). **Variabilidad genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae) mediante el uso de marcadores microsatelitales**. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 425-436.
- SERRANO-GÓMEZ, S. S., GUEVARA-CHUMACERO, L. M., BARRIGA-SOSA, I. D., ULLÓA-ARVÍZU, R., GONZÁLEZ-GUZMÁN, S., & VÁZQUEZ-PELÁEZ, C. G. (2016). **Low levels of genetic diversity in *Crocodylus acutus* in Oaxaca and Guerrero, Mexico, and molecular-morphological evidence of the presence of *C. moreletii***. *Biochemical Systematics and Ecology*, 69, 51-59.
- SEUTIN, G., WHITE, B. N., & BOAG, P. T. (1991). Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian journal of zoology*, 69(1), 82-90.

- SHAFIEI-ASTANI, B., ONG, A. H. K., VALDIANI, A., TAN, S. G., YIEN, C. Y. S., AHMADY, F., ALITHEEN, N. B., NG, W. L. & KUAR, T. (2015). **Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): comparative potentials of SSRs versus ISSRs.** *Gene*, 571(1), 107-116.
- SHARMA, S. P., KATDARE, S., ZAIDI, Z., GHAZI, M. G., GUPTA, S. K., & HUSSAIN, S. A. (2021). **Mitochondrial DNA analysis reveals extremely low genetic diversity in a managed population of the Critically Endangered Gharial (*Gavialis gangeticus*, Gmelin, 1789).** *Herpetological Journal*, 30(4).
- SHARMA, S. P., GHAZI, M. G., KATDARE, S., DASGUPTA, N., MONDOL, S., GUPTA, S. K., & HUSSAIN, S. A. (2021). **Microsatellite analysis reveals low genetic diversity in managed populations of the critically endangered gharial (*Gavialis gangeticus*) in India.** *Scientific Reports*, 11(1), 5627.
- SHARMA, S. P., GHAZI, M. G., KATDARE, S., BADOLA, R., & HUSSAIN, S. A. (2024). **Population status and genetic assessment of mugger (*Crocodylus palustris*) in a tropical regulated river system in North India.** *Scientific Reports*, 14(1), 7438.
- SHEEJA, T. E., KUMAR, I. P. V., GIRIDHARI, A., MINOO, D., RAJESH, M. K., & BABU, K. N. (2021). **Amplified fragment length polymorphism: applications and recent developments.** *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 187-218.
- SHIRLEY, M. H., VILLANOVA, V. L., VLIET, K. A., & AUSTIN, J. D. (2014). **Genetic barcoding facilitates captive and wild management of three cryptic African crocodile species complexes.** *Animal Conservation*, 18(4), 322-330.
- SHIRLEY, M.H.; VLIET, K.A.; CARR, A.N.; AUSTIN, J.D. 2014. **Rigorous approaches to species delimitation have significant implications for African crocodile systematics and conservation.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281(1776): 20132483.
- SHIRLEY, M.H.; CARR, A.N.; NESTLER, J.H.; VLIET, K.A.; BROCHU, C.A. 2018. **Systemic revision of the living African Slender-snouted crocodiles (*Mecistops* Gray, 1844).** *Zootaxa* 4504(2): 151-193.
- SIROSKI, P. A.; AMAVET, P. S.; POLETTA, G. L.; BASSETT, L. A. B. **As ferramentas moleculares aplicadas na conservação dos crocodilianos.** 2021. Repositorio Institucional CONICET
- SINGH, R. K., AJJIM, J., LANG, J. W., SEGU, H., RAMESH, H., & VASUDEVAN, K. (2024). **Population genetics of gharial *Gavialis gangeticus* in the Chambal River, India, using novel polymorphic microsatellite markers.** *Endangered Species Research*, 53, 127-138.
- SMOLENSKY, N. L., HURTADO, L. A., & FITZGERALD, L. A. (2015). **DNA barcoding of Cameroon samples enhances our knowledge on the distributional limits of putative species of *Osteolaemus* (African dwarf crocodiles).** *Conservation Genetics*, 16, 235-240.
- SOMAWEERA, R.; NIFONG, J.; ROSENBLATT, A.; BRIEN, M. L.; COMBRINK, X.; ELSEY, R. M.; GRIGG, G.; MAGNUSSON, W. E.; MAZZOTTI, F. J.; PEARCY, A.; PLATT, S. G.; SHIRLEY, M. H.; TELLEZ, M.; VAN DER PLOEG, J.; WEBB, G.; WHITAKER, R.; WEBBER, B. L. (2020). **The ecological importance of crocodylians: towards evidence-based justification for their conservation.** *Biological Reviews*, 95(4), 936–959. <https://doi.org/10.1111/brv.12594>

- SRIKULNATH, K., THONGPAN, A., SUPUTTITADA, S., & APISITWANICH, S. (2012). **New haplotype of the complete mitochondrial genome of *Crocodylus siamensis* and its species-specific DNA markers: distinguishing *C. siamensis* from *C. porosus* in Thailand.** *Molecular Biology Reports*, 39, 4709-4717.
- STRAKOVÁ, H. (2013). **Molecular identification of purebredness and kinship of the Philippine crocodile (*Crocodylus mindorensis*) and the Cuban crocodile (*C. rhombifer*) for ex situ conservation management.**
- STRICKLAND, B. A., FLOOD, P. J., KLINE, J. L., MAZZOTTI, F. J., HEITHAUS, M. R., TREXLER, J. C. (2023). **An apex predator engineers wetland food-web heterogeneity through nutrient enrichment and habitat modification.** *Journal of Animal Ecology*, 92(7), 1388-1403
- TABORA, J. A. G., HINLO, M. R. P., BAILEY, C. A., LEI, R., POMARES, C. C., REBONG, G., WEERD, M. V., ENGBERG, S. E., BRENNEMAN, R. A. & LOUIS JR, E. (2012). **Detection of *Crocodylus mindorensis* x *Crocodylus porosus* (*Crocodylidae*) hybrids in a Philippine crocodile systematics analysis.** *Zootaxa*, 3560(1), 1-31.
- TINGEY, S. V., RAFALSKI, J. A., & HANAFEY, M. K. (1994). **Genetic analysis with RAPD markers.** In *Plant Molecular Biology: Molecular Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism* (pp. 491-500). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- VALE, R. B.; DOS SANTOS MARTINS, D. **Aquicultura: sistemas sustentáveis para criação de jacarés.** *Zootecnia sustentável: desde os primórdios até os dias atuais*, v. 13635, p. 90, 2023.
- VALENCIA, C. A., PERVAIZ, M. A., HUSAMI, A., QIAN, Y., ZHANG, K., VALENCIA, C. A., ... & ZHANG, K. (2013). **Sanger sequencing principles, history, and landmarks.** *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics*, 3-11.
- VAN ASCH, B., VERSFELD, W. F., HULL, K. L., LESLIE, A. J., MATHEUS, T. I., BEYTELL, P. C., PREEZ, P. D., SLABBERT, R. & RHODE, C. (2019). **Phylogeography, genetic diversity, and population structure of Nile crocodile populations at the fringes of the southern African distribution.** *PLoS One*, 14(12), e0226505.
- VASCONCELOS, W. R. (2005). **Diversidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) da Amazônia.**
- VASCONCELOS, W. R., HRBEK, T., SILVEIRA, R. D., THOISY, B. D., MARIONI, B., & FARIAS, I. P. (2006). **Population genetic analysis of *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) from South America.** *Genetics and Molecular Biology*, 29, 220-230.
- VASCONCELOS, W. R., HRBEK, T., DA SILVEIRA, R., DE THOISY, B., RUFFEIL, L. A. A. D. S., & FARIAS, I. P. (2008). **Phylogeographic and conservation genetic analysis of the black caiman (*Melanosuchus niger*).** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 600-613.
- VASCONCELOS, B. D., CAMURUGI, F., MUDREK, J. R., BRANDÃO, R. A., & SANTANA, D. J. (2024). **Rivers and spatial distance are drivers of genetic diversity in the south American dwarf caiman (*Paleosuchus palpebrosus*).** *Journal of Zoology*.

- VASHISTHA, G., DEEPIKA, S., DHAKATE, P. M., KHUDSAR, F. A., & KOTHAMASI, D. (2020). **The effectiveness of microsatellite DNA as a genetic tool in crocodilian conservation.** *Conservation Genetics Resources*, 12(4), 733-744.
- VASHISTHA, G., DEEPIKA, S., KHUDSAR, F. A., DHAKATE, P. M., & KOTHAMASI, D. (2021). **Anthropogenic restocking of gharial individuals prevents genetic isolation of gharial population in Girwa River, India by geographic barriers imposed by a barrage.**
- VENEGAS-ANAYA, M., CRAWFORD, A. J., ESCOBEDO GALVÁN, A. H., SANJUR, O. I., DENSMORE III, L. D., & BERMINGHAM, E. (2008). **Mitochondrial DNA phylogeography of Caiman crocodilus in Mesoamerica and South America.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 614-627.
- VELO-ANTON, G., GODINHO, R., CAMPOS, J. C., & BRITO, J. C. (2014). **Should I stay or should I go? Dispersal and population structure in small, isolated desert populations of West African crocodiles.** *PLoS One*, 9(4), e94626.
- VERDADE, L. M., ZUCOLOTO, R. B., & COUTINHO, L. L. (2002). **Microgeographic variation in Caiman latirostris.** *Journal of experimental Zoology*, 294(4), 387-396.
- VERDADE, L. M., PIÑA, C. I., SIMONCINI, M., & SILVA-BRANDÃO, K. L. (2021). **How genetic tools can help crocodilians' management and governance.** *Conservation Genetics of New World Crocodilians*, 203-214.
- VILLEGAS, A., ROJAS-SANTOYO, A., & ULLOA-ARVIZU, R. (2022). **Population genetics and molecular identification of Crocodylus acutus and C. moreletii (Crocodylia: Crocodylidae) in captive and wildlife populations.** *Revista de Biología Tropical*, 70(1), 67-81.
- VILLELA, P. M. S., COUTINHO, L. L., PIÑA, C. I., & VERDADE, L. M. (2008). **Macrogeographic genetic variation in broad-snouted caiman (Caiman latirostris).** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 628-636.
- VLIET, K.; SHIRLEY, M.; ROSS, P.; ROBERTO, I. 2024. **Living crocodylians of the world (2024).** *Crocodile Specialist Group Newsletter* 43(2): 15-22.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T. V. D., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995). **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- WANG, Y. Q., ZHU, W. Q., HUANG, L., ZHOU, K. Y., & WANG, R. P. (2006). **Genetic diversity of Chinese alligator (Alligator sinensis) revealed by AFLP analysis: An implication on the management of captive conservation.** *Biodiversity & Conservation*, 15, 2945-2955.
- WEAVER, J. P., RODRIGUEZ, D., VENEGAS-ANAYA, M., CEDEÑO-VÁZQUEZ, J. R., FORSTNER, M. R., & DENSMORE III, L. D. (2008). **Genetic characterization of captive Cuban crocodiles (Crocodylus rhombifer) and evidence of hybridization with the American crocodile (Crocodylus acutus).** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(10), 649-660.
- WILKIE, C. J. **Assessing hybridization between Morelet's crocodile (Crocodylus moreletii) and American.** (2022) *Zoomorphology*, 136(4), 387-441.

- WILKIE, C. J., TELLEZ, M., JONES, G., & GENNER, M. J. (2024). **Population genetic structure of Morelet's and American crocodiles in Belize: hybridization, connectivity and conservation.** *Conservation Genetics*, 25(2), 585-590.
- WILLIAMS, R. C. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *American Journal of Physical Anthropology*, v. 32, n. S10, p. 159-184, 1989.
- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., & TINGEY, S. V. (1990). **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- WILLIS, R. E. (2009). **Transthyretin gene (TTR) intron 1 elucidates crocodylian phylogenetic relationships.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), 1049-1054.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). **PCR- RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(4), 1350-1355.
- WU, X. B., WANG, Y. Q., ZHOU, K. Y., ZHU, W. Q., NIE, J. S., WANG, C. L., & XIE, W. S. (2002). **Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD).** *Biological conservation*, 106(3), 435-441.
- XU, Q., FANG, S., WANG, Z., & WANG, Z. (2005). **Microsatellite analysis of genetic diversity in the Chinese alligator (*Alligator sinensis*) Changxing captive population.** *Conservation Genetics*, 6, 941-951.
- XU, Q., & FANG, S. (2006). **Variable number tandem repeats in the mitochondrial DNA Control region of the Chinese alligator, *Alligator sinensis*.** *Amphibia-Reptilia*, 27(1), 93-101.
- Yan, P., Wu, X., Wang, Y., Jiang, Z., Gu, C., & Wang, C. (2006). **AFLP Analysis of genetic variation on captive-bred Chinese alligators: an application to select individuals for release.** *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 25(6), 479-490.
- YANG, S., LAN, T., ZHANG, Y., WANG, Q., LI, H., DUSSEX, N., SAHU, S. K., SHI, M., HU, M., ZHU, Y., CAO, J., LIU, L., LIN, J., WAN, QH., LIU, H. & FANG, S. G. (2023). **Genomic investigation of the Chinese alligator reveals wild-extinct genetic diversity and genomic consequences of their continuous decline.** *Molecular Ecology Resources*, 23(1), 294-311.
- YU, D., PENG, J., HU, S., GAO, S., FU, M., HU, H., & ZOU, J. (2011). **Analysis of genetic variation and bottleneck in a captive population of Siamese crocodile using novel microsatellite loci.** *Conservation Genetics Resources*, 3(2), 217-220.
- ZHAI, T., YANG, H. Q., ZHANG, R. C., FANG, L. M., ZHONG, G. H., & FANG, S. G. (2017). **Effects of population bottleneck and balancing selection on the Chinese alligator are revealed by locus-specific characterization of MHC genes.** *Scientific Reports*, 7(1), 5549.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., & LABUDA, D. (1994). **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** *Genomics*, 20(2), 176-183.

ZUCOLOTO, R. B., VILLELA, P. M. S., VERDADE, L. M., & COUTINHO, L. L. (2006). **Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (Caiman spp and Paleosuchus palpebrosus)**. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 75-78.

ZUCOLOTO, R. B., FARIAS, I. P., & AMAVET, P. S. (2021). **Molecular markers applied to conservation genetics of american crocodilians**. *Conservation Genetics of New World Crocodilians*, 31-77.

ZUCOLOTO, R. B., BOMFIM, G. C., DE CAMPOS FERNANDES, F. M., SCHNADELBACH, A. S., PIÑA, C. I., & VERDADE, L. M. (2021). **Effective population size of broad-snouted caiman (Caiman latirostris) in Brazil: A historical and spatial perspective**. *Global Ecology and Conservation*, 28, e01673.