

IGOR SALLES DE OLIVEIRA

ESTUDOS POPULACIONAIS E PROSPECÇÕES GENÔMICAS DE *BOTHROPS*
INSULARIS (SERPENTES, VIPERIDAE): implicações para a conservação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2022

IGOR SALLES DE OLIVEIRA

ESTUDOS POPULACIONAIS E PROSPECÇÕES GENÔMICAS DE *BOTHROPS*
INSULARIS (SERPENTES, VIPERIDAE): implicações para a conservação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria José de Jesus
Silva

Versão Original

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor

Salles-Oliveira, Igor
Estudos populacionais e prospecções
genômicas de *Bothrops insularis*: implicações para a
conservação / Igor Salles-Oliveira; orientadora:
Maria José de Jesus Silva. -- São Paulo, 2022.
143 p.

Dissertação (Mestrado) --
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências
Biomédicas.

1. Endogamia. 2. Genética de
populações. 3. Insular. 4. Jararaca-ilhoa. 5.
Mitogenômica. I. Silva, Maria José de J.,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA - DISSERTAÇÃO

Candidato(a): Igor Salles de Oliveira

Título da Dissertação: Estudos populacionais e prospecções genômicas de *Bothrops insularis*
(Serpentes, Viperidae): implicações para a conservação

Orientadora: Profa. Dra. Maria José de Jesus Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a .
...../..... /....., considerou

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da diversidade genética de *Bothrops insularis* (Squamata, Serpentes) ex-situ, baseada em sequências de microssatélites.", protocolada sob o CEUA nº 3124270617, sob a responsabilidade de **Maria José de Jesus Silva e equipe; Igor Salles de Oliveira; Kalena Barros da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 13/09/2017.

We certify that the proposal "Genetic diversity evaluation in *Bothrops insularis* (Squamata, Serpentes) ex-situ, based on microsatellite sequences.", utilizing 61 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 3124270617, under the responsibility of **Maria José de Jesus Silva and team; Igor Salles de Oliveira; Kalena Barros da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/13/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **05/2021** Área: **Lab. Especial de Ecologia E Evolução**

Origem:	Animais provenientes de outros estudos						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 10 anos	N:	61
Linhagem:	<i>Bothrops insularis</i>	Peso:	100 a 999 g				

Resumo: *Bothrops insularis*, também conhecida como Jararaca Ilhoa, é uma espécie de serpente endêmica da Ilha da Queimada Grande, São Paulo, considerada criticamente ameaçada de extinção. Em decorrência da sua vulnerabilidade, o Laboratório Especial de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, mantém uma população de *B. insularis* para fins de reprodução, conservação ex situ e condução de pesquisas científicas. Nenhuma caracterização da variabilidade genética foi realizada até o momento da população mantida em cativeiro. Nessa perspectiva, o presente estudo pretende caracterizar a variabilidade genética dos indivíduos de *B. insularis* por meio do uso de microssatélites e, assim, auxiliar no desenvolvimento de estratégias reprodutivas baseadas em aspectos genéticos, contribuindo para o fortalecimento e conservação da espécie.

Local do experimento: Laboratório Especial de Ecologia e Evolução (LEEV) - Instituto Butantan.

São Paulo, 13 de setembro de 2017



Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

São Paulo, 12 de maio de 2021
CEUA N 3124270617

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maria José De Jesus Silva
Área: Lab. Especial De Ecologia E Evolução

Título da proposta: "Avaliação da diversidade genética de *Bothrops insularis* (Squamata, Serpentes) ex-situ, baseada em sequências de microssatélites."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB (ID 004375)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 26/abril/2021) da proposta acima referenciada.


Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezados Senhores, Gostaria de solicitar a prorrogação de prazo de vigência da licença obtida para o projeto que já está em andamento (Protocolo CEUAIB nº.3124270617), sob minha orientação, desenvolvido pelo mestrando Igor Salles de Oliveira. Solicitamos que a licença seja prorrogada, com o novo prazo final de vigência para: 28 de fevereiro de 2022. A solicitação é necessária em decorrência da evolução do cenário pandêmico brasileiro desde março de 2020, acarretando impossibilidade de realização de experimentos no laboratório presencialmente, uma vez que: (i) o aluno encontra-se isolado, evitando a ida ao laboratório devido a orientações médicas por ser portador de doença crônica imunossupressora, consequentemente, parte do grupo de risco; (ii) o atraso na realização de atividades de bancadas devido a mudança das dependências do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, realizada entre novembro de 2019 e fevereiro de 2020; (iii) a suspensão de atividade nas dependências do Laboratório de Ecologia e Evolução, durante períodos no ano de 2020 e, atualmente, entre março e abril de 2021; (iv) a ausência de serviços terceirizados funcionando no período de 2020. No momento atual, o projeto apresenta um breve atraso, porém com a maioria das etapas propostas já concluídas ou em fase final de conclusão. As etapas concluídas envolvem a obtenção de amostras de tecidos, estabelecimento de protocolos para sequenciamento de nova geração (NGS), e montagem do genoma mitocondrial. Foram iniciadas a etapas de montagem do genoma nuclear e desenvolvimento de microssatélites, as quais estão em andamento. As etapas de caracterização dos microssatélites específicos precisaram ser adiadas para o 1º e 2º semestres de 2021 devido à ausência de empresas terceirizadas que realizassem as análises de fragmentos de microssatélites durante o período pandêmico de 2020. A solicitação dessa prorrogação não acarretará alteração no número de animais a serem utilizados para a realização da pesquisa, uma vez que tecidos de animais serão obtidos a partir da doação de outros estudos em desenvolvimento no Instituto Butantan e instituições parceiras. A documentação referente à cessão desses tecidos será devidamente anexada ao relatório final do projeto. "

Comentário da CEUA: "".

Nova previsão de término da proposta: **02/2022**



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maria José De Jesus Silva
Área: Lab. Especial De Ecologia E Evolução

Título da proposta: "Estudos populacionais e prospecções genômica de *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae): implicações para a conservação".

CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 27/janeiro/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 27/janeiro/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Vimos solicitar a alteração do nome do projeto intitulado "Avaliação da diversidade genética de *Bothrops insularis* (Squamata, Serpentes) ex situ, baseada em sequências de microssatélites, número de comissão de ética 3124270617, para o nome "Estudos populacionais e prospecções genômica de *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae): implicações para a conservação. A solicitação decorre da necessidade de adequação do nome do projeto para o título final da dissertação oriunda do projeto desenvolvido, para que a mesma possa ser depositada junto à Pós-Graduação. Essa alteração representa um processo natural de ampliação de dados, aplicação de novos programas e novas metodologias disponibilizadas na literatura e consequente amadurecimento da proposta inicial do aluno. Esclarecemos que as alterações referentes ao desenvolvimento do projeto já foram aprovadas pela comissão de ética por meio das ementas submetidas ao decorrer do mesmo. A adequação é somente do título. Adicionalmente, realizamos a alteração dos item financiador para CNPQ, uma vez que o aluno está recebendo a bolsa de mestrado do CNPQ (130387/2020-7). Também, foi atualizado o nome do responsável pelo departamento ao qual o aluno e pesquisadora estão associados. Agradecemos desde já, Cordialmente."



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Dedico este trabalho à minha avó: Maria Aparecida de Salles (*in memoriam*), que sempre me apoiou e incentivou a seguir meus sonhos, nunca se esquecendo que o mais importante levamos e guardamos em nossos corações.

Sempre a levarei em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Isabel Aparecida de Salles Oliveira e Leopoldino Leite de Oliveira, meu irmão e familiares por todo o apoio financeiro, sentimental e psicológico que dispuseram para que eu pudesse realizar mais essa etapa da minha formação pessoal e profissional.

À minha avó, Maria Aparecida de Salles, que sempre me incentivou durante a minha formação e me ensinou a ser a pessoa que sou hoje.

À Dra. Maria José de Jesus Silva, que nos anos de convivência e orientação, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal. Obrigado por toda a paciência, disposição e confiança depositada para eu me tornar o profissional que sou hoje.

À Dra. Soraia Attie Calil Jorge que gentilmente me auxiliou durante o processo de inscrição, matrícula e obtenção de bolsa.

À Dra. Taís Machado por todo o ensinamento e auxílio durante o meu processo de crescimento científico e intelectual.

À Dra. Selma Maria de Almeida Santos, Dra. Nancy Oguiura e Dr. Otávio Marques pelas doações de tecidos, permissão para uso dos animais, auxílio no laboratório e informações cedidas, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho de forma precisa.

Aos meus amigos e amigas de laboratório: Ingrid Lima e Lima, João Miguel Alves Nunes, Juliana Passos, Karina Rodrigues da Silva Banci, Natália Torello, Nicholas Panzenboeck Lotto, Leonardo Sanches, Lucas Henrique, Silara Batista, Sérgio Daniel Cubides Cubillos; por todo o apoio, ensinamentos, puxões de orelha e momentos que tivemos juntos: obrigado.

Agradeço em especial à: (i) Bruna Mika Senzaki, por todas as conversas que tivemos dentro e fora do laboratório, levarei nossa amizade eternamente e estarei aqui para te auxiliar no que precisar e conseguir; (ii) Mariana Dias Guilardi, por todas as conversas e ensinamentos técnicos e profissionais, obrigado por me aturar durante meus dias de mau humor no laboratório e reclamações; (iii) Karina Rodrigues da Silva Banci, por todas as conversas dentro e fora do laboratório, apoio profissional e pessoal, ensinamentos técnicos e profissionais e pela doação e auxílio na aquisição de tecidos dos animais provenientes da Ilha; todas vocês foram e serão pessoas muito importantes na minha vida.

A todos os técnicos e ex-alunos do Laboratório de Ecologia e Evolução, assim como aos demais técnicos do Instituto Butantan, que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste projeto, em especial: Leonardo S. Kobashi, Regiane Spirandelli da Silva, Kalena Barros da Silva, Kelly Kish, Juliana Passos e Felipe C. B. Calvacanti.

Ao Instituto Butantan por ter me acolhido desde o ano de 2017, me dando condições e permitindo o uso de suas dependências para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também à Fundação Butantan e ao Centro de Desenvolvimento Científico pelo auxílio financeiro.

Ao Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” – ESALQ/USP pelos serviços, excelentes, prestados: construção da biblioteca genômica e Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

Ao Núcleo de Bioinformática e Biologia Computacional (NBBC) do Instituto Butantan, que realizou as análises bioinformáticas, bem como a montagem do mitogenoma e da primeira versão do genoma de *Bothrops insularis*, reportados neste projeto. Em especial, ao Dr. Milton Nishiyama Jr. e Dr. José S. L. Patané, que coordenaram as respectivas análises e me ensinaram conhecimentos técnicos e profissionais.

À Universidade de São Paulo por ter me acolhido desde o ano de 2019, como discente no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP/Instituto Butantan/IPT). Em especial às secretárias, Fábiana e Eliane, que sempre me auxiliaram durante momentos de dúvidas, matrículas e recebimento de bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq), o qual contribuiu com a concessão de bolsa – nível mestrado – processo: #130387/2020-7, desde março de 2020.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a qual contribuiu com a concessão de bolsa – nível TT3 – processo: #2017/04774-1, vinculado ao auxílio regular da FAPESP – processo: 2014/02885-2; durante o período de abril a setembro de 2017, permitindo o início da pesquisa, que culminou neste mestrado.

*“Goodbye - said the fox. This is my secret. It is very simple.
You only see clearly with your heart. The important
things are invisible to the eyes.”*

The Little Prince

Saint-Exupéry, Antoine; 1943.

RESUMO

SALLES-OLIVEIRA, I. **Estudos populacionais e prospecções genômicas de *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae): implicações para a conservação.** 2022. 143 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Nas últimas décadas, a Conservação da Biodiversidade tem contribuído para minimizar e evitar processos de extinção, porém a utilização de dados genéticos para a conservação é baixa em alguns grupos taxonômicos, como por exemplo, Serpentes. Adicionalmente, a obtenção de informações genômicas completas das espécies é restrita a poucos grupos e escassa para serpentes brasileiras. *Bothrops insularis* é uma espécie criticamente em perigo e endêmica da Ilha da Queimada Grande, localizada na costa do estado de São Paulo, cujas informações de genética de população, genoma (nuclear e mitocondrial) completos são ausentes na literatura. Nesse contexto, o presente estudo objetivou acessar e caracterizar informações genéticas acerca de *B. insularis* a fim de contribuir com dados importantes para sua conservação. O genoma de *B. insularis* foi recuperado como uma molécula de 1,5 Gpb (67,8 % do genoma predito), com 20X de profundidade de cobertura. Devido à baixa profundidade de cobertura, a integridade do genoma recuperado ainda é baixa (65% de proteínas conservadas) e, apenas, 9% de regiões repetitivas e elementos transponíveis foram acessados. Ainda assim, foi possível realizar a prospecção de 6078 marcadores microssatélites específicos, dos quais 117 foram selecionados para serem testados e caracterizados. A reconstrução do mitogenoma de *B. insularis* recuperou uma molécula de 17.523 pb, constituída por 13 genes codificantes de proteínas, 22 tRNA, dois rRNA, duas regiões controle, uma região de origem de replicação da fita leve, uma duplicata do tRNA-F e uma região não codificante. A análise comparativa dos mitogenomas de 129 serpentes, incluindo o de *B. insularis*, permitiu a identificação de 18 mitogenomas. Os rearranjos observados ocorrem em três regiões altamente suscetíveis a mutações e podem estar associados a processos de deleção, duplicação e translocação. A caracterização da diversidade genética de *B. insularis* em nível populacional, empregando 11 microssatélites heterólogos recuperou: (i) valores baixos (diversidade alélica) e médios (heterozigose) de diversidade genética para as duas populações estudadas – *ex situ* e *in situ*; (ii) valor significativo do coeficiente de endocruzamento por parentesco para a população *in situ*; (iii) existência de diferenciação populacional entre as duas populações; e (iv) ausência de correlação entre os agrupamentos genéticos e os pontos amostrados, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre os indivíduos na população *in situ*. Além disso, foi possível indicar seis casais prioritários, a fim de evitar a ocorrência de endocruzamento, e clarificar a relação de parentescos incertos de

indivíduos da população *ex situ*. Sob a perspectiva de conservação, se faz necessário monitorar continuamente as populações e proceder à incorporação de novos indivíduos da ilha para a população *ex situ* (a fim de evitar endocruzamento e adaptação ao cativeiro), bem como garantir a manutenção da similaridade genética entre as populações. Além disso, as análises comparativas dos mitogenomas recuperaram divergências genéticas entre *B. insularis* e *B. jararaca*, possivelmente, decorrentes de pressões e processos evolutivos distintos, corroborando a classificação dessa espécie como uma unidade evolutivamente significativa. É recomendável que os dados genéticos obtidos sejam integrados a outros estudos para auxiliar a execução e delimitação de estratégias de conservação para *B. insularis*.

Palavras-chave: Endogamia. Genética de populações. Insular. Jararaca-ilhoa. Mitogenômica.

ABSTRACT

SALLES-OLIVEIRA, I. **Genomic prospections and populational studies of *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae): Conservation implications.** 2022. 143p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Biodiversity Conservation efforts have been contributing to reduce and avoid species extinction. However, the use of genetic data for conservation is scarce for some taxons, such as snakes. The availability of complete genomic data of snakes are restricted to few species and still scarce on Brazilian snakes. *Bothrops insularis*, the golden-lancehead, is a critically endangered species endemic to Ilha da Queimada Grande, São Paulo State (Brazil), which lacks population genetics and the complete genomic information. This study aims to access and characterize the genetic information of *B. insularis* in order to contribute to the Conservation of this species. The genome of *B. insularis* was recovered as a molecule with 1.5 Gbp (67,8% of the predicted genome) after a 20X coverage depth and that is why the entirety (65%) and the characterization of repetitive and transposable elements (9%) were low. However, we were able to predict 6078 specific microsatellites, from which 117 were chosen to be characterized and tested in *B. insularis* populations. The *B. insularis* mitogenome was recovered as a 17.523 bp long circular molecule, which encompasses 13 protein-coding genes, 22 tRNA, two rRNA, two control regions, one non-coding region and one tRNA-F duplicate. Comparisons among 129 snake species allowed us to identify 18 types of mitogenomes. Rearrangements were recovered in three hotspot regions for mutations and could have been originated due to duplications, deletion, and translocation. Genetic diversity using 11 informative heterologous microsatellites recovered: (i) low values of allelic content and medium values for heterozygosity indexes for both populations: the *ex situ* (kept in the Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan) and *in situ* (Ilha da Queimada Grande); (ii) significative value of inbreeding coefficient of genogram for the *in situ* population; (iii) the occurrence of populational differentiation between *ex* and *in situ* populations; and (iv) no relationship among genetic clusters and sampling sites of the island, which suggest the occurrence of gene flow among individuals in the *in situ* population. Furthermore, based on the results, we indicate six preferential couples to carry out preferential crosses and avoid inbreeding; we also resolve uncertain relationships in the *ex situ* population based on the genetic variability observed. Under a conservation perspective, continuous monitoring of both populations and the incorporation of new *in situ* representatives in the *ex situ* population (aiming to avoid inbreeding and captive adaptation) are suggested. Moreover, the divergence recovered in comparative analyses

between *B. insularis* and its mainland sister species – *B. jararaca* – mitogenomes suggest that these species are under distinctive evolutionary processes, which corroborate the classification of *B. insularis* as an evolutionary significant unit (ESU). The information provided herein should be integrated with other studies to help the development and execution of conservation efforts for *B. insularis*.

Keywords: Endogamy. Golden-lancehead. Insular. Mitogenomic. Population genetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - *Bothrops insularis* da Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil 38
- Figura 2** - Áreas de amostragem das populações de *Bothrops insularis*. (A) Mapa topográfico com destaque para o estado de São Paulo, indicando as localizações das populações *ex situ* (1 – círculo vermelho) e *in situ* (2 e 3 – círculo preto). (B) Mapa de vegetação Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil – uso autorizado; indicando as áreas de amostragem (2 – círculo amarelo; 3 – círculo azul claro) 43
- Figura 3** - Diagrama do mitogenoma de *Bothrops insularis* 57
- Figura 4** - Estrutura secundária dos tRNA preditos para *B. insularis*. Note a ausência do caule (braço) na duplicata do tRNA-Phe (F*) em comparação a presença do caule (braço) no tRNA-Phe (F) 59
- Figura 5** - Representação gráfica dos mitogenomas de espécies do gênero *Bothrops*: *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. pubescens*. Além da representação circular em miniatura, um diagrama linear foi desenhado para cada uma das espécies a fim de auxiliar na visualização e compreensão das divergências estruturais. Componentes gênicos que divergem entre as espécies estão destacados pelas cores: rosa escuro = região não codificante; lilás = duplicata do tRNA-Phe (F*); rosa fluorescente = duplicata do tRNA-Prolina (P*) 60
- Figura 6** - Índice de seleção (ω) para cada gene codificante de proteína entre as espécies do gênero *Bothrops* 62
- Figura 7** - Diagramação das estruturas de mitogenomas (mitótipos) recuperados para Serpentes. Os mitogenomas foram nomeados de 1 a 3, 3A – 3J. Apesar de circular, cada mitótipo foi ilustrado de forma linear para melhor visualização. Fitas pesada (H) e leve (L) são indicadas pela ausência e presença de setas, respectivamente. Genes envolvidos em processos de rearranjos estão destacados em diferentes cores. Nomes de genes, tRNAs e rRNAs são apresentados de forma abreviada 63
- Figura 8** - Árvore filogenética obtida por meio do método de máxima verossimilhança, a partir de uma matriz de 13 genes de proteínas codificantes e duas subunidades do rRNA mitocondrial. Os números próximos aos nós são os valores de suporte obtidos. Os números em negrito, próximos aos círculos aos mitogenomas 1 a 3J. Os mitogenomas 1 a 3J representam os mesmos mitogenomas descritos na Figura 7. A cor de cada ramo e círculo indica o mitogenoma recuperado para a espécie ou família 66

Figura 9 - Estruturação genética de *Bothrops insularis* obtida utilizando 11 microssatélites e o programa STRUCTURE. (A) Gráfico da probabilidade de *likelihood* como uma função de K (método de Prob (Ln|K); melhor K = 1). (B) Gráfico de ΔK para *B. insularis* (método de Evanno; melhor K = 2). (C) Gráfico de barras apresentando a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos agrupamentos genéticos (K = 2) 71

Figura 10 - Estrutura genética de *Bothrops insularis* usando 11 microssatélites e a análise discriminantes de componentes principais. (A) Gráfico do Critério Bayesiano de Informação (do inglês *Bayesian Information Criterion* – BIC) em função de K (melhor K = 5). (B) Gráfico da pontuação de alfa (*α -scored*) em função do número de componentes principais (PC; melhor número de PCs = 6). (C) Gráfico de barras apresentando a probabilidade de cada indivíduo pertencer a um determinado agrupamento (K = 5). Note a existência de um agrupamento exclusivo à população *ex situ* (laranja) e a ausência de correlação entre as áreas de amostragem (2 e 3) com os agrupamentos recuperados (vermelho, cinza, azul e verde) na população *in situ*. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados relativos à montagem dos genomas individuais e total de <i>B. insularis</i>	55
Tabela 2 - Organização gênica do mitogenoma de <i>Bothrops insularis</i>	58
Tabela 3 - Distância genética e similaridade nucleotídica entre as espécies do gênero <i>Bothrops</i> : <i>B. insularis</i> , <i>B. jararaca</i> , <i>B. diporus</i> e <i>B. pubescens</i>	61
Tabela 4 - Composição nucleotídica das espécies do gênero <i>Bothrops</i> : <i>B. insularis</i> , <i>B. jararaca</i> , <i>B. diporus</i> e <i>B. pubescens</i>	61
Tabela 5 - Características diagnósticas de cada estrutura de mitogenoma observada em Serpentes.....	64
Tabela 6 - Índices de diversidade obtidos a partir de marcadores microssatélites para as populações de <i>Bothrops insularis</i>	70
Tabela 7 - Índices de diferenciação genética das populações <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> de <i>Bothrops insularis</i>	70
Tabela 8 - Análise de parentesco entre os descendentes de possíveis parentais. Valor de p obtido por meio do programa <i>ML-Relate</i>	73
Tabela 9 - Lista de pares sugeridos para acasalamento preferencial, de acordo com os dados obtidos por microssatélites	73
Tabela 10 - Informações estatísticas dos genomas de Serpentes disponíveis do <i>GenBank</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina.

A/ ALA – RNA de transferência Alanina.

AMOVA – do inglês *Analysis of Molecular Variance*; Análise de variância molecular.

ARIE – Área de Relevante Interesse Ecológico.

AT – Porcentagem somada de Adenina e Timina.

AT_{skew} – Inclinação AT.

ATP – Adenosina trifosfato.

AZA – do inglês *Association of Zoos & Aquariums*; Associações de Zoológicos e Aquários.

BIC – do inglês *Bayesian Information Criterion*; Critério de Informação Bayesiana.

Bins – *Bothrops insularis*.

Bmar – *Bothrops marmoratus*.

Bmat – *Bothrops matogrossensis*.

Bpau – *Bothrops pauloensis*.

C – Citosina.

C/ CYS – RNA de transferência Cisteína.

CEUAIB – Comissão de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan.

CEVAP – Centro de Estudos de Veneno e Animais Peçonhentos.

CI – Intervalo de confiança.

CG – Porcentagem de citosina e guanina.

CG_{skew} – Inclinação CG.

CR – Região Controle.

D/ASP - RNA de transferência Aspartato/ Ácido aspártico.

D* - pseudo-RNA de transferência Aspartato/ Ácido aspártico.

DAPC – do inglês *Discriminant Analysis of Principal Components*; Análise Discriminante de Componentes Principais.

DN – Taxa de mutação não-sinônima.

DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico.

DNTPs – do inglês *deoxyribonucleotide triphosphate*; Desoxirribonucleotídeos trifosfato.

DS – Taxa de mutação sinônima.

E/ GLU - RNA de transferência Glutamato/ Ácido glutâmico.

E.g. – do latim *Exempli gratia*; Por exemplo.

Em prep. – Em preparação.

Esalq – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz.

ESU – do inglês *Evolutionary Significant Unit*; Unidade Evolutivamente Significativa.

F/ PHE – RNA de transferência Fenilalanina.

F* - pseudo-RNA de transferência Fenilalanina.

G – Guanina.

G/ GLY – RNA de transferência Glicina.

GBS – do inglês *Genotyping by Sequencing*; Genotipagem por sequenciamento.

H/ HIS – RNA de transferência Histidina.

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

I/ ILE – RNA de transferência Isoleucina.

I* - pseudo-RNA de transferência Isoleucina.

IAM – do inglês *Infinite Allele Model*; Modelo de Alelo Infinito.

IB USP – Instituto de Biociências - USP.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis.

IBD – do inglês *Identical by Descent*; Idêntico por descendência.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Biodiversidade.

IUCN – do inglês *International Union Conservation for Nature*; União Internacional para Conservação da Natureza.

K/ LYS – RNA de transferência Lisina.

L1/ LEU1 – RNA de transferência Leucina 1.

L2/ LEU2 – RNA de transferência Leucina 2.

LEEV – Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan.

M/ MET – RNA de transferência Metionina.

MCMC – do inglês *Markov Chain Monte Carlo*; Cadeias de Markov de Monte Carlo.

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio.

MN – Número de mutações não-sinônimas.

MS – Número de mutações sinônimas.

mtDNA – DNA Mitocondrial.

N/ ANS – RNA de transferência Asparagina.

N* - pseudo-RNA de transferência Asparagina.

NBBC – Núcleo de Bioinformática e Biologia Computacional do Instituto Butantan.

ng – nanograma.

NGS – do inglês *Next-Generation Sequencing*; Sequenciamento de nova geração.

nuDNA – DNA Nuclear.

OL – do inglês *Origin of light-strand replication*; Origem de replicação da fita leve.

OXPHOS - do inglês *Oxidative Phosphorylation*; Fosforilação oxidativa.

P – RNA de transferência Prolina.

P* – pseudo-RNA de transferência Prolina.

pb – pares de base.

PC – do inglês *Principal Component*; Componente Principal.

PCG – do inglês *Protein Coding Genes*; genes codificantes de proteínas.

P. ex. – Por exemplo.

Q/ GLN – RNA de transferência Glutamina.

R/ ARG – RNA de transferência Arginina.

RAPD – do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*; Amplificação de polimorfismos randômicos de DNA.

RNA – do inglês *Ribonucleic Acid*; Ácido ribonucleico.

rRNA – RNA ribossômico.

S1/ SER1 – RNA de transferência Serina 1.

S2/ SER2 – RNA de transferência Serina 2.

S2* - pseudo-RNA de transferência Serina 2.

SDS – Dissulfeto de Sódio.

SMM – do inglês *Stepwise Mutation Model*; Modelo de Mutação Gradual.

SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*; Polimorfismos de nucleotídeos únicos.

SP – São Paulo.

SSR – do inglês *Single Sequence Repeat*; Sequências de repetições simples.

T – Timina.

T/ THR – RNA de transferência Treonina.

TDRD – do inglês *Tandem Duplication followed by Random Deletion*; Duplicação em tandem seguida de deleção aleatória.

tRNA - RNA de transferência.

V/VAL – RNA de transferência Valina.

W/TRP – RNA de transferência

Y/TYR – RNA de transferência Tirosina.

U – Uracila.

USP – Universidade de São Paulo.

LISTA DE SÍMBOLOS

A – Número de alelos.

D_{est} – Índice de diferenciação populacional de Jost.

F_{is} – Coeficiente de endocruzamento por sistema de acasalamento.

f_{is} – Coeficiente de endocruzamento por genograma ou parentesco.

F_{st} – Índice de diferenciação populacional de Wright.

G_{st}' – Índice de diferenciação populacional de Hendrick.

He – Heterozigose esperada.

Ho – Heterozigose observada.

PA – Alelos privados.

R – Coeficiente de parentesco.

α – Alfa.

Δ – Delta.

λ – Lambda.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1. Conservação da biodiversidade	28
1.2. Genética e a conservação das espécies	29
1.2.1. <i>Variáveis genéticas populacionais</i>	30
1.2.2. <i>Abordagens genéticas aplicadas à conservação</i>	32
1.2.2.1. <i>Microsatélites</i>	32
1.2.2.2. <i>Genoma mitocondrial</i>	33
1.2.3. <i>Genoma nuclear e mitocondrial de Serpentes</i>	35
1.3. O gênero <i>Bothrops</i> (<i>sensu stricto</i>)	37
1.3.1. <i>Bothrops insularis</i>	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. METODOLOGIA	42
3.1. Coleta de amostras	42
3.2. Caracterização do genoma nuclear e do mitogenoma de <i>B. insularis</i>	43
3.2.1. <i>Extração de DNA, construção de biblioteca e sequenciamento de nova geração</i>	43
3.2.2. <i>Montagem do genoma nuclear e do mitogenoma de <i>B. insularis</i></i>	44
3.2.2.1. <i>Processamento dos reads</i>	44
3.2.2.2. <i>Genoma nuclear de <i>B. insularis</i></i>	44
3.2.2.3. <i>Mitogenoma de <i>B. insularis</i></i>	45
3.3. Revisão do mitogenoma de Serpentes	46
3.3.1. <i>Obtenção de sequências</i>	46
3.3.2. <i>Análise comparativa do mitogenoma de Serpentes do gênero <i>Bothrops</i></i>	47
3.3.3. <i>Análise comparativa dos mitogenomas de Serpentes</i>	47
3.3.4. <i>Reconstrução filogenética</i>	47
3.4. Prospecção de microsatélites específicos de <i>B. insularis</i>	49
3.5. Genética de população de <i>B. insularis</i>	49
3.5.1. <i>Amplificação e genotipagem de microsatélites heterólogos</i>	49
3.5.2. <i>Análises genéticas populacionais</i>	50
3.5.2.1. <i>Controle de qualidade, teste de desequilíbrio de ligação e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>	50

3.5.2.2. Índices de diversidade genética.....	50
3.5.2.3. Índices de endocruzamento	51
3.5.2.4. Efeito gargalo	51
3.5.2.5. Estruturação genética populacional.....	51
3.5.3. Manejo genético e reprodutivo da população ex situ mantida no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan.....	53
4. RESULTADOS	53
4.1. Caracterização do genoma e do mitogenoma de <i>B. insularis</i>	53
4.1.1. Análise bioinformática dos dados obtidos a partir do sequenciamento	53
4.1.1.1. Controle de qualidade e seleção dos reads para a montagem do genoma e mitogenoma de <i>B. insularis</i>	53
4.1.1.2. Genoma de <i>B. insularis</i> v. 1.0	53
4.1.1.3. Mitogenoma de <i>B. insularis</i>	55
4.2. Mitogenoma de Serpentes	60
4.2.1. Comparação do mitogenoma de Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	60
4.2.2. Evolução do mitogenoma de Serpentes.....	62
4.3. Prospecção de marcadores microssatélites específicos de <i>B. insularis</i>.....	68
4.4. Genética de população de <i>B. insularis</i>	68
4.4.1. Diversidade genética.....	69
4.4.2. Endocruzamento.....	69
4.4.3. Efeito gargalo.....	69
4.4.4. Índices de diferenciação populacional.....	69
4.4.5. Estruturação genética populacional	70
4.4.6. Manejo genético e reprodutiva da população ex situ de <i>B. insularis</i>	72
5. DISCUSSÃO	74
5.1. Genoma de <i>B. insularis</i> v.1.0	74
5.2. Caracterização e evolução do mitogenoma de Serpentes	78
5.3. Genética de população de <i>Bothrops insularis</i>	83
5.4. Genética de <i>B. insularis</i> e suas implicações para conservação	86
6. CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE 1	
APÊNDICE 2	
APÊNDICE 3	
APÊNDICE 4	

APÊNDICE 5

APÊNDICE 6

APÊNDICE 7

APÊNDICE 8

APÊNDICE 9

APÊNDICE 10

APÊNDICE 11

APÊNDICE 12

APÊNDICE 13

APÊNDICE 14

APÊNDICE 15

ANEXO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conservação da biodiversidade

A biodiversidade, como definida por Primack e Rodrigues (2001), refere-se à “riqueza da vida na terra, os milhões de plantas, animais e microrganismos, os genes que possuem e os intrincados ecossistemas que ajudam a construir no meio ambiente”. Atualmente, são reconhecidos três níveis de biodiversidade: a diversidade ecológica, a diversidade de espécie e a diversidade genética, sendo a conservação dessas diversidades um desafio que vem ganhando destaque nas últimas décadas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

A emergência da conservação da biodiversidade, em todos os seus níveis, estimulou o desenvolvimento da área de biologia da conservação, uma ciência de caráter multidisciplinar, cujos principais objetivos são: (i) entender os efeitos da atividade humana nas espécies, comunidade e ecossistemas, e (ii) desenvolver abordagens práticas para prevenir a extinção da biodiversidade (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Apesar de processos de extinções serem naturais e relatados ao longo da história da vida na terra (ver BARNOSKY et al., 2011; HAUTMAN, 2012; PURVIS; JONES; MACE, 2000), o impacto antrópico nas espécies tem se mostrado um grande agravante, acelerando em alguns casos os processos de extinção (CEBALLOS et al., 2015; SANDOM et al., 2014).

Atualmente, os fatores responsáveis pela extinção de uma espécie podem ser separados em (i) fatores extrínsecos e (ii) fatores intrínsecos (COLLEN et al., 2011; MURRAY et al., 2011): os primeiros se relacionam a alterações no ambiente (p. ex. perda de habitat), enquanto os intrínsecos são relativos a aspectos ecológicos (p. ex. dieta; maturação sexual), demográficos (p. ex. efeito gargalo) e genéticos da espécie (p. ex. grau de diversidade genética). Segundo Lawler et al. (2006), os principais fatores extrínsecos que influenciam na vulnerabilidade das espécies são: a perda e alteração do habitat, a introdução de espécies exóticas, poluição, exploração e doenças. Essas perturbações, associadas a fatores intrínsecos, podem aumentar a vulnerabilidade e/ou levar a espécie à extinção (BENNETT et al., 2005; MURRAY et al., 2011). Por isso, se faz necessária a compreensão de quais fatores podem estar associados à vulnerabilidade da espécie, bem como a mitigação desses fatores para sua conservação (LAWLER et al., 2006).

Com base nisso, duas estratégias principais têm sido empregadas: (i) conservação *in situ*, definida como a preservação da comunidade e populações em seu habitat natural; e (ii) a conservação *ex situ*, definida como a preservação de comunidades naturais e populações em ambiente artificial, sob supervisão humana (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Diversos estudos demonstram que a conservação *in situ* é a melhor estratégia, no entanto, em alguns casos, quando tal estratégia é dificultada por diversas variáveis, a conservação *ex situ* passa a ser a única estratégia a ser desenvolvida. Independentemente de qual seja a estratégia mais efetiva, ambas são, na maioria das vezes, complementares e utilizadas em conjunto (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; WITZENBERGER; HOCHKIRCK, 2011).

Mais recentemente, Allendorf, Luikart e Aitken (2013) reiteram que a conservação requer uma abordagem balanceada, baseada na proteção do habitat, na história natural e na viabilidade individual da espécie, analisando aspectos demográficos e genéticos da espécie, da comunidade e do ecossistema (habitat da espécie).

1.2. Genética e a conservação das espécies

A partir da década de 1960, os marcadores moleculares começaram a ser empregados em estudos biológicos (HOSHINO et al., 2012). Tais marcadores apresentam vantagens em relação aos marcadores fenotípicos, como, por exemplo, a possibilidade de serem encontrados em várias partes do genoma (introns, exons, regiões reguladoras, entre outros.) e, no caso de marcadores codominantes, a possibilidade de distinguir indivíduos homozigotos e heterozigotos (MONDINI; NOORANI; PAGNOTTA, 2009).

Historicamente, diversos marcadores vêm sendo utilizados para a obtenção de dados genéticos e moleculares. Inicialmente, essa diversidade era medida por meio de estudos cromossômicos e de aloenzimas, e, mais recentemente, empregando marcadores genômicos e análises metagenômicas – p. ex. polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *single nucleotide polymorphisms* – SNPs) e genoma mitocondrial (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2011; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

A partir de 1985, houve um aumento nos estudos que relacionam informações genéticas à conservação de espécies, uma vez que a compreensão dos aspectos genéticos desempenha um papel importante para a delimitação e nos esforços de conservação (IUCN, 2002; 2020a;

LARSON et al., 2012; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013; AZA, 2020). Os dados relativos à diversidade genética de populações selvagens e cativas têm se mostrado úteis para avaliar as consequências de ações antrópicas (p. ex. fragmentação de habitat), elucidar padrões e processos biológicos (p. ex. existência de fluxo gênico e de estruturação populacional) e auxiliar na definição e avaliação de áreas e espécies prioritárias para a conservação (ver MADSEN et al., 2000; MICHAELIDIS; COLE; FUNK, 2015; MONZÓN-ARGUELLO et al., 2015; MCALILEY et al., 2016; ARRUDA; COSTA; RECCO-PIMENTEL, 2017; WALLIS, 2019). No entanto, Wallis (2019) destaca que as abordagens genéticas possuem limitações para alguns táxons quanto à definição de populações viáveis mínimas, reintroduções, inferência de fluxo gênico e, em alguns casos, na delimitação das espécies. Para superar essas limitações, abordagens genéticas devem ser associadas a outros conhecimentos científicos (p. ex. características morfológicas, tendências reprodutivas e demográficas) em uma abordagem integrativa (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

Abordagens de conservação, *ex situ* e *in situ*, têm focado na retenção da diversidade genética por um período mínimo – geralmente, 100 anos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Porém, outros eventos, como variações demográficas, adaptação ao cativeiro, impactos antropogênicos e ocorrência de endocruzamento, podem levar a uma redução e dissimilaridade da diversidade genética nas populações. Em casos severos, a perda dessa diversidade pode levar as populações a um vórtex de extinção e, conseqüentemente, a sua extinção iminente, como pode ser observado para os lobos (*Canis lupus*) de Isle Royale nos Estados Unidos da América (FRANKHAM, 2010; WEST et al., 2018; HEDRICK et al., 2019). Por isso, o manejo de populações selvagens e cativas tem focado na manutenção de populações viáveis sob o ponto de vista demográfico, genético e reprodutivo. Dessa forma, são realizados monitoramentos contínuos de parâmetros populacionais e genéticos - esse último com o intuito de minimizar e evitar a ocorrência de endocruzamento, exocruzamento e adaptação ao cativeiro (IUCN, 2002; SHAFER et al., 2015).

1.2.1. Variáveis genéticas populacionais

Dentre a extensa literatura na área de conservação, há uma constância entre as variáveis genéticas utilizadas para estudos populacionais, sendo as principais: (i) a diversidade (variabilidade) genética da população e/ou da espécie alvo (p. ex. DUAN et al., 2017); (ii) a taxa de endocruzamento da população (p. ex. WANG et al., 2015); (iii) o grau de diferenciação

e isolamento entre as populações de uma espécie (p. ex. GALLEGO-GARCÍA et al., 2018); e (iv) o padrão de estruturação genética populacional (p. ex. AKINS; AUBRY; SACKS, 2018).

A diversidade genética é definida como qualquer variação nos nucleotídeos, alelos, genes, cromossomos ou no genoma total dos organismos (HOSHINO et al., 2012) e provê uma visão do passado, presente e futuro de determinada população ou espécie (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). É uma estimativa importante para o manejo e conservação das espécies, pois permite a detecção de eventos (endogamia, depressão endogâmica, efeito gargalo, entre outros) e se relaciona com o valor adaptativo/evolutivo da espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Pode ser estudada em dois níveis: (i) intrapopulacional, ou seja, dentro de uma única população; e (ii) interpopulacional, entre duas ou mais populações (HOSHINO et al., 2012; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

Para isso, os parâmetros mais utilizados na descrição e aferição da diversidade genética são: (i) o grau de polimorfismo; (ii) a diversidade alélica; e (iii) a heterozigose. O grau de polimorfismo é a porcentagem de variação existente no loco ou no marcador utilizado. A diversidade alélica refere-se à quantidade de alelos existentes por loco. E, por fim, a heterozigose refere-se à taxa de indivíduos/genótipos heterozigotos existentes por loco, sendo classificada como observada (proporção de heterozigotos amostrados) e esperada (estimativa de heterozigotos esperados se a população estiver em equilíbrio – Equilíbrio de Hardy-Weinberg – HWE) (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

A partir dos padrões observados de diversidade genética, bem como dos dados gerados para cada indivíduo, é possível avaliar as variáveis relativas ao endocruzamento, à consanguinidade entre os indivíduos, às divergências entre populações e à estruturação genética populacional de uma espécie.

A endogamia é definida como o acasalamento de indivíduos aparentados entre si (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013), a qual, associada a eventos demográficos, pode gerar baixa diversidade genética da população e, a longo prazo, levar populações a um estado de iminente extinção, devido ao vórtex de extinção (FRANKHAM, 2010; WEST et al., 2018; HEDRICK et al., 2019). Dois índices relativos à endogamia têm sido discutidos na literatura (TEMPLETON, 2011): (i) o coeficiente de endocruzamento de sistema de acasalamento (F_{is}), cujo objetivo é investigar o sistema de acasalamento vigente na população; e (ii) o coeficiente de endocruzamento de genograma (f_{is}), também denominado coeficiente de endocruzamento de

parentesco, cujo objetivo é investigar a probabilidade de um indivíduo exibir um alelo que seja idêntico por descendência (do inglês *identical by descent*, IBD) devido ao grau de parentesco dos parentais.

A estrutura populacional pode ser definida como a existência de populações isoladas, parcialmente isoladas, efetivamente únicas ou metapopulações existentes em determinada área geográfica, por meio do uso de dados e informações morfológicas, demográficas e, mais recentemente, genéticas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). A caracterização da estrutura populacional, a partir de dados relativos à diversidade genética, vem permitindo uma compreensão da história evolutiva da população, bem como da divergência e existência de fluxo gênico entre populações, tendo um papel importante no manejo e na conservação das espécies (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

1.2.2. Abordagens genéticas aplicadas à Conservação

1.2.2.1. Microsatélites

Marcadores microsatélites ou SSR, considerados por Hoshinho et al. (2012) como os mais promissores marcadores moleculares baseados em PCR, foram detectados no genoma eucarioto há cerca de 40 anos, sendo sua existência documentada em 1982, por Hamada, Petrino e Kakunaga, e a sua natureza polimórfica confirmada em 1989 por Litt e Luty (HAMADA; PETRINO; KAKUNAGA, 1982; LITT; LUTY, 1989; SENAN et al., 2014).

Historicamente, os SSR têm sido apontados como marcadores neutros e, apesar de amplamente aplicados, pouco se sabe acerca da sua importância e função biológica, embora estudos recentes sugiram que sua localização pode interferir em diferentes estruturas no DNA, na recombinação, replicação, tradução e expressão gênica (HOSHINO et al., 2012; VIEIRA et al., 2016). Os SSR podem ser definidos como sequências (motivos) que contêm de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, de tamanho variado, podendo apresentar unidades de repetição de mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Adicionalmente, apresentam como características e vantagens em relação a outros marcadores moleculares o fato de apresentarem herança codominante, alta taxa de mutação (cerca de 10^{-2} a 10^{-6} por loco por geração), natureza multi-alélica, ampla distribuição no genoma e a existência de possível transferência entre espécies, ou seja, os marcadores desenvolvidos para uma espécie podem ser amplificados em espécies próximas (amplificação heteróloga) devido a conservação das suas regiões flanqueadoras (HOSHINO et al., 2012; VIEIRA et al., 2016).

Os SSR são observados em organismos eucariotos e procariotos e encontrados em genomas nucleares, mitocondriais e cloroplastidiais (CAMACHO, 2016; VIEIRA et al., 2016). Estudos recentes vêm demonstrando que sua distribuição no genoma é ampla, porém não randômica, de modo que existem em menor porcentagem em regiões codificantes do que em regiões não-codificantes. Além disso, é observada uma predominância de SSR com motivos de repetição com unidades de tri- e hexanucleotídeos em regiões codificantes, resultante de pressão seletiva contra mutações que alterem o quadro de leitura (VIEIRA et al., 2016).

Atualmente, devido ao maior acesso as tecnologias para o sequenciamento completo do genoma (nuclear e mitocondrial), o desenvolvimento de marcadores microssatélites engloba os seguintes estágios: (i) obtenção e conhecimento básico da sequência nucleotídica em que os SSR ocorrem, a partir do sequenciamento de nova geração (NGS); (ii) desenvolvimento de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) complementares às regiões flangeadoras dos SSR; (iii) validação dos *primers* por meio de PCR e eletroforese do produto amplificado; e (iv) genotipagem e detecção dos polimorfismos entre os indivíduos (SENAN et al., 2014; VIEIRA et al., 2016).

Os marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em diversas áreas, por exemplo, em mapeamento genômico, na seleção auxiliada por marcadores, na identificação e caracterização da diversidade genética, na relação e divergência entre populações, na análise de estruturação populacional, na identificação de hibridização, análise de fluxo gênico, identificação de indivíduos, determinação de paternidade, bio-invasão e epidemiologia (HOSHINHO et al., 2012; LUKOSCHEK; WAYCOTT; KEOGH, 2018).

Ainda que apresentem muitas vantagens sobre outros marcadores moleculares, os SSR podem apresentar erros de genotipagem nos dados finais devido a múltiplas variáveis (qualidade do DNA, qualidade do reagente, contaminação, erros de leitura, entre outros). No geral, podemos citar três limitações no uso desse marcador: (i) a existência de alelos nulos, (ii) a existência de homoplasias e (iii) a existência de desequilíbrio de ligação (HOSHINO et al., 2012; VIEIRA et al., 2016).

1.2.2.2. Genoma mitocondrial

A mitocôndria é uma organela presente na maioria todos os organismos eucariotos, associada à produção de energia (Adenosina Trifosfato – ATP) – a partir do processo de

fosforilação oxidativa (OXPHOS) –, ao crescimento celular, ao controle do ciclo celular (GRAY, 1989; 2012; BERNT et al., 2013a), ao processo de apoptose, doenças e envelhecimento (BOORE, 1999; PHILLIPS; SIMPKINS; ROBY, 2014). Apesar de algumas hipóteses terem sido aventadas para explicar a origem dessa organela (ver GRAY, 2012), a mais aceita é a hipótese de origem endossimbiótica (TAANMAN, 1999; GRAY, 2012; BERNT et al., 2013a). Essa organela possui um genoma exclusivo (genoma mitocondrial – mitogenoma), com herança materna (para exceções ver BERNT et al., 2013a) e um sistema de tradução específico, que difere daquele encontrado no citosol (GRAY, 2012).

As moléculas do DNA mitocondrial (mtDNA), em sua grande maioria, são circulares (BOORE, 1999) e estão associadas à produção de complexos enzimáticos responsáveis pela OXPHOS e da maquinaria de tradução desses polipeptídios – RNA ribossômico mitocondrial (rRNA) e RNA de transferência (tRNA) (GRAY, 1989; 2012). Os cinco complexos enzimáticos relacionados ao sistema OXPHOS são: (I) NADH-ubiquinona oxidorreductase; (II) Succinato-ubiquinona oxidorreductase; (III) Ubiquinona-citocromo c oxidorreductase; (IV) Citocromo c oxidase; e (V) ATP sintase (TAANMAN, 1999; GRAY, 2012). Porém, em alguns casos (p. ex. mitogenoma de metazoários), somente os complexos I, III, IV e V (citados acima) são encontrados, por meio das seguintes unidades: (i) complexo I – nd1-6, 4-L; (ii) complexo III – cyt b; (iii) complexo IV – cox1-3; e (iv) complexo V – atp6 e 8 (BERNT et al., 2013a; 2013b).

O avanço das técnicas de sequenciamento tem permitido o acesso a genes específicos e a obtenção de moléculas completas para diversas espécies (TAANMAN, 1999; GRAY, 2012). Por questões históricas e devido ao sequenciamento de uma única região, a maioria das sequências usadas para inferências filogenéticas e filogeográficas são provenientes de genes específicos e/ou fragmentos de genes (MACEY et al., 1997). Porém, devido ao acesso às moléculas completas, atualmente seu uso é possível em diversas abordagens, incluindo estudos evolutivos relacionados a detecção de regiões adaptadas no mitogenoma (JACOBSEN et al., 2016), na delimitação de estratégias de conservação (HARLEY et al., 2016), delimitação de espécies e estudos populacionais (TOWNSEND et al., 2004; CARD et al., 2016; FOLT et al., 2019).

Apesar das potencialidades, a aplicação de tais abordagens na conservação da biodiversidade ainda é inicial e exploratória, apresentando desafios em decorrência da complexidade de análises genômicas, a existência de *pipelines* (direcionamentos) bem definidos, a necessidade crescente de recursos humanos especializados na interpretação e

aplicação de dados genômicos e bioinformáticos, e a baixa aplicação de métodos não-invasivos para a obtenção de amostras de DNA para o sequenciamento de nova geração (THADEN et al., 2020).

1.2.3. Genoma nuclear e mitocondrial de Serpentes

O desenvolvimento de novas tecnologias associado ao empenho e desempenho de diversos grupos de pesquisas nacionais e internacionais têm permitido a compreensão, avaliação e prospecção de genomas nucleares completos para um amplo número de organismos. O primeiro genoma completo de répteis escamados descrito foi o de *Anolis carolinensis* (ALFÖLDI et al., 2011), que realizou a prospecção e identificação de genes da espécie, bem como, o mapeamento dos *scaffolds* em seus respectivos cromossomos. Desde então, diversos projetos almejando a compreensão e caracterização de genomas de répteis vêm sendo desenvolvidos.

O primeiro genoma de Serpentes descrito foi o rascunho pertencente a *Python molurus*, destacando-se o potencial uso desses organismos como modelos para compreender processos adaptativos a ambientes específicos (p. ex. altas altitudes) (CASTOE et al., 2011). O avanço da descrição dos genomas de serpentes permitiu a compreensão de elementos relacionados ao veneno e sua evolução (p. ex. EARL et al., 2016; SHIBATA et al., 2018), a seleção de genes relacionados à adaptação a ambientes específicos (KISHIDA et al., 2019; LI et al., 2018; LI et al., 2021), às características de dieta (MCGLOTTHIN et al., 2014) e à compreensão da composição e tamanho do genoma (p. ex. CASTOE et al., 2011; PASQUESI et al., 2018).

De forma geral, o genoma de Serpentes tem um tamanho variando entre 1,3 Gpb e 2,8 Gpb, com um nível moderado de ilhas de elementos repetitivos e transponíveis (em média 41,8%), sendo esta variação ligada a uma pequena escala de tempo, o que sugere uma rápida adaptação e evolução desses elementos (PASQUESI et al., 2018). O tamanho é similar àquele de genomas observados em aves (1,0 – 2,1 Gpb), considerados menores do que o tamanho de genomas observados em mamíferos (2,2 – 6,0 Gpb) (PASQUESI et al., 2018). Vale destacar, que apesar do tamanho similar, o genoma de Serpentes difere do genoma de aves pela alta taxa e alta variação de ilhas de elementos repetitivos e transponíveis (PASQUESI et al., 2018).

Destaca-se que a caracterização do genoma de Serpentes, associado aos estudos citogenéticos das espécies, têm permitido a identificação de sinais de rearranjos (fusão e fissão),

bem como a identificação de genes específicos (tanto genes relacionados ao veneno como relacionados aos cromossomos sexuais) (SHIBATA et al., 2018; SURYAMOCHAN et al., 2020; LI et al., 2021), de modo que a prospecção dos genomas e sua utilização de forma multidisciplinar, empregando múltiplos métodos, pode auxiliar na compreensão de padrões e processos evolutivos, e na conservação das espécies.

Os primeiros genomas mitocondriais (mitogenomas) completos foram descritos para o *Homo sapiens* (ANDERSON et al., 1981) e para o camundongo *Mus musculus* (BIBB et al., 1981), os quais mostraram a composição típica do mitogenoma de metazoa (BERNT et al., 2013a; 2013b; STOGER; SCHRÖDL, 2013): 13 genes codificantes para proteínas (PCG), 2 subunidades do rRNA (12S; 16S), 22 tRNA e uma região não codificante (região controle). Desde as primeiras descrições, diversos estudos foram realizados a fim de se compreender a estrutura do mitogenoma e seu uso para análises evolutivas em todos os filos (GRAY, 1989; BOORE, 1999; BERNT et al., 2013a). Apesar de a composição gênica ser similar, mudanças na estrutura e tamanho dos mitogenomas são reportados entre (BOORE, 1999; PEREIRA, 2000; LAVROV, 2007; BERNT et al., 2013a; 2013b) e dentro dos grupos taxonômicos (p. ex. Anellida – TEMPESTINI et al., 2020; Artropoda – ZHU et al., 2018; Mollusca – STOGER; SCHRÖDL, 2013; Vertebrata – ZHOU et al., 2014; SATOH et al., 2016). Essas variações são apontadas como caracteres úteis para análises filogenéticas (MACEY et al., 1997; BOORE, 1999; PEREIRA, 2000).

As primeiras discussões sobre o mitogenoma de Serpentes envolveram a composição dos agrupamentos de tRNA e possíveis rearranjos, realizadas em 1995 e 1996, a partir das análises do DNA mitocondrial da cobra cega do Texas, *Rena dulcis* (KUMAZAWA; NISHIDA, 1995) e da serpente venenosa *Ovophis okinavensis*, encontrada nas ilhas Ryukyu (KUMAZAWA et al., 1996). O primeiro mitogenoma completo de serpentes foi descrito para *Lycodon semicarinatus* (KUMAZAWA et al., 1998) e, nesse trabalho, os autores realizaram uma análise comparativa entre os dados de mtDNA de serpentes já existentes, identificando rearranjos relacionados à existência de duplicatas de tRNA (tRNA-Phe – F*: *O. okinavensis*; tRNA-Pro - P*: *L. semicarinatus*), ausência da região de origem de replicação da fita leve (OL) em *R. dulcis* e existência de duas regiões controle nos mitogenomas de *O. okinavensis* e *L. semicarinatus*. Desde então, tem sido crescente a caracterização de mitogenomas de serpentes na literatura, existindo oito revisões abordando sua evolução e organização (KUMAZAWA, 2004; DONG; KUMAZAWA, 2005; DOUGLAS; JANKE; ARNASON, 2006; JIANG et al.,

2007; CHEN; ZHAO, 2009; OGUIURA; FERRARI; BATISTIC, 2009; YAN; LI; ZHOU, 2009; QIAN et al., 2018), de modo que foi indicada a existência de 11 rearranjos relacionados aos tRNA e regiões não codificantes (incluindo região controle I e II; região de origem de replicação da fita leve; e regiões não anotadas/não codificantes).

1.3. O gênero *Bothrops* (*sensu stricto*)

Atualmente, são conhecidas cerca de 11.690 espécies de répteis, sendo o Brasil um dos países com a maior representatividade dessa biodiversidade, composta por 847 espécies, das quais 422 são serpentes (BATAUS et al., 2011; UETZ et al., 2021). O Brasil é considerado um país megadiverso quanto a sua fauna e flora, devido aos altos índices de endemismo e riqueza de espécies associados a regiões consideradas *hotspots* de biodiversidade (ICMBio/MMA, 2018a). O último censo da fauna brasileira ameaçada de extinção, disponibilizado no livro Vermelho da Fauna Brasileira, identificou 34 espécies de serpentes classificadas sob algum grau de ameaça (ICMBio/MMA, 2018b), sendo a maioria contemplada em planos nacionais de conservação. Apesar da melhora e do avanço da conservação de serpentes brasileiras (NAVEGA-GONÇALVES; PORTO, 2016), somente um estudo focou na obtenção de parâmetros genéticos populacionais, o qual utilizou informações obtidas de amplificação aleatória de DNA polimórfico (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) em populações da serpente venenosa *Bothrops moojeni* para caracterizar a diversidade genética, bem como avaliar o grau de endocruzamento e a estruturação genética da espécie, provendo dados importantes para sua conservação (ver DUTRA et al., 2008).

O gênero *Bothrops* é um grupo de serpentes venenosas neotropicais altamente diverso e amplamente distribuído na América do Sul (incluindo Brasil), com alta importância ecológica e médica (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Esse gênero engloba 46 espécies reconhecidas (UETZ et al., 2021) e outras espécies recém descritas (ver Barbo *et al.*, 2022a; 2022b), das quais 12 são classificadas como endêmicas e/ou em algum grau de ameaça (RODRIGUES, 2005; NAVEGA-GONÇALVES; PORTO, 2016; Barbo *et al.*, 2022a; 2022b), que podem ser alocadas em seis grupos (BARBO et al., 2016): grupo *B. alternatus*, grupo *B. atrox*, grupo *B. jararacussu*, grupo *B. jararaca*, grupo *B. neuwiedi* e grupo *B. taeniatus*.

O grupo *B. jararaca* compreende seis espécies conhecidas: *B. jararaca* (WIED, 1824), *B. alcatraz* (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002), *B. insularis* (AMARAL, 1921), *B. germanoi* (BARBO et al., 2022a), *B. otavioi* (BARBO et al., 2012) e *B. sazimai* (BARBO et

al., 2016), das quais somente *B. jararaca* é encontrada no continente, com distribuição geográfica ao longo das áreas de Floresta Atlântica, do sudeste da Bahia até o nordeste do Rio Grande do Sul (CAMPBELL; LAMAR, 2004; BARBO et al., 2012; 2016). As demais espécies são endêmicas de ilhas distribuídas no litoral dos estados de São Paulo (*B. alcatraz* – Ilha de Alcatrazes, *B. insularis* – Ilha da Queimada Grande, *B. germanoi* – Ilha da Moela, *B. otavioi* – Ilha da Vitória) e Espírito Santo (*B. sazimai* – Ilha dos Franceses).

1.3.1. *Bothrops insularis*

B. insularis (Fig.1), popularmente conhecida como jararaca-ilhoa, foi descrita por Afrânio do Amaral (AMARAL, 1921) e é uma espécie com ocorrência na Ilha da Queimada Grande (0.43 km²), localizada a 33 km do litoral do estado de São Paulo (24°30'S e 43°42'O). Atualmente, essa ilha integra a Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) das Ilhas da Queimada Pequena e Queimada Grande, sendo considerada de grande interesse de conservação por apresentar algumas espécies endêmicas, dentre as quais se destaca *B. insularis* (BRASIL, 1985; MAGALHÃES, 2015).

Figura 1 - *Bothrops insularis* da Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil.



Fonte: Karina R. S. Banci.

Desde sua descrição, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para a compreensão da história natural, composição e ação do veneno, caracterização genética (dados citogenéticos e sequências parciais de genes mitocondriais) e evolução de *B. insularis* (BEÇAK, 1964; BEÇAK et al., 1990; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Morfologicamente, indivíduos adultos apresentam coloração castanho-amarelada na região ventral e dorsal da cabeça e na região dorsal do corpo, podendo apresentar padrões de manchas distribuídos na região dorsal do corpo. A região ventral é uniformemente amarelada ou creme, porém alguns indivíduos contêm manchas (marcas) castanhas ao longo das bordas

ventrais. Os indivíduos juvenis apresentam coloração róseo-amarelada ou róseo-acastanhada na região dorsal com manchas fracas e coloração amarelada ou creme na região ventral, como os adultos (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Além disso, apresenta menor tamanho corporal quando comparada à *B. jararaca* (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; PASSOS, 2018).

Foram observadas variações ontogenéticas na alimentação, no veneno e no uso de hábitat para *B. insularis*. Indivíduos juvenis alimentam-se de pequenos sapos, lagartos ou lacraias e são encontrados em maior número no solo (DUARTE; PUORTO; FRANCO, 1995; MARQUES et al., 2012; PASSOS, 2018); os adultos alimentam-se exclusivamente de aves migratórias, predando predominantemente *Turdus flavipes* e *Elaenia chilensis* (MARQUES et al., 2012; PASSOS, 2018), e são encontrados em diversos tipos de vegetação (árvores e arbustos), porém, podem também ser observados no solo (DUARTE; PUORTO; FRANCO, 1995; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013).

Acerca da biologia reprodutiva, sabe-se que de *B. insularis* apresenta um ciclo reprodutivo sazonal, similar ao de *B. jararaca*, com corte e cópulas observadas durante o outono e início do inverno, ovulação durante a primavera, prenhez desde a primavera até o verão e o recrutamento dos filhotes durante o verão (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; PASSOS, 2018). Além disso, os estudos apontam (i) a existência de dimorfismo sexual, com fêmeas de tamanho corpóreo maior em relação aos machos (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; PASSOS 2018), (ii) a ausência de combate entre machos (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013) e (iii) a existência de fêmeas, denominadas intersexuais, com hemiclitoris de tamanhos e formas variáveis (KASPEROVICZUS, 2009; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Os primeiros dados genéticos da espécie se relacionam à sua caracterização cariotípica e comparação de dados meióticos com aqueles de *B. jararaca* (BEÇAK et al., 2003). O cariótipo de *B. insularis* foi descrito por Beçak em 1964 e é similar aos descritos para espécies do gênero *Bothrops* com $2n = 36$, sendo 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos, e sistema de determinação de sexo do tipo ZZ/ZW, sendo as fêmeas heterogaméticas (BEÇAK et al., 1964). Porém, de acordo com os autores, polimorfismos no cromossomo sexual W sugerem a existência de alterações cariotípicas intraespecíficas, as quais foram associadas à existência de fêmeas interssexo (BEÇAK et al., 1990; BEÇAK et al., 2003).

Estudos moleculares e outras abordagens desenvolvidas ao longo dos últimos anos sugerem que *B. insularis* teria passado por um processo de especiação alopátrica, a partir de uma população costeira do ancestral de *B. jararaca*, localizada ao norte do Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. Tal processo teria ocorrido durante o Pleistoceno tardio, ao final do último máximo glacial (11 mil anos atrás), devido a flutuações do nível do mar e isolamento de uma parcela da população do ancestral de *B. jararaca* na Ilha (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002; GRAZZIOTIN et al., 2006). Apesar dessa hipótese ser a mais aceita na literatura, um estudo recente (HAMDAN et al., 2020) aventa que colonizações, bem como a chegada de novos indivíduos a população isolada à ilha, podem ter ocorrido por meio do deslocamento a nado para a ilha do ancestral comum de *B. jararaca* e *B. insularis*.

Ainda que o acesso a ilha seja restrito à marinha e pesquisadores científicos autorizados, ameaças que colocam a espécie em risco, como queimadas e ações humanas (captura de espécimes e biopirataria), têm sido reportadas desde o final dos anos 1990 (DUARTE; PUORTO; FRANCO, 1995; MARTINS; SAWAYA; MARQUES, 2008; GUIMARÃES et al., 2014). Essas ameaças, juntamente à distribuição geográfica restrita e evidências de declínio populacional em 2008 (MARTINS MARTINS; SAWAYA; MARQUES, 2008), levaram a classificação de *B. insularis* como criticamente em perigo, de acordo com: (i) os parâmetros B1ab(iii) e B2ab(iii) da União Internacional para a Conservação da Natureza (do inglês *International Union for Conservation of Nature – IUCN*; IUCN, 2018); e (ii) o Livro Vermelho da Fauna Brasileira (ICMBio/MMA, 2018b).

Nesse contexto, cinco programas de conservação *ex situ* foram criados em centros de pesquisas brasileiros. A população *ex situ* mantida no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV), Instituto Butantan, foi criada em 2009/2010 com 20 fundadores, sob licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Processo nº 25.650-1), objetivando o desenvolvimento e crescimento de uma população saudável e viável que poderia ser usada para pesquisas científicas e conservação, esta última somente em caso extremo (KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Até o momento, o manejo reprodutivo tem sido realizado com base na viabilidade espermática para a seleção dos machos (SILVA et al., 2015) e análises do estágio e grau de vitelogênese com auxílio de equipamentos de raios-x, para a seleção das fêmeas. Apesar dos registros de cruzamento, nenhum *studybook* tem sido mantido para essa população, ocasionando dúvidas de paternidade e maternidade dos indivíduos que constituem o plantel.

As abordagens genéticas e moleculares se restringem a estudos citogenéticos (BEÇAK, 1964; BEÇAK et al., 1990; BEÇAK et al., 2003), filogenéticos (ALENCAR et al., 2016) e filogeográficos (GRAZZIOTIN et al., 2006). Não há relatos sobre a caracterização e comparação do mitogenoma dessa espécie, embora haja descrição dos mitogenomas de espécies próximas, como *B. jararaca* e representantes do grupo-irmão (*Bothrops* gr. *neuwiedi*), *B. diporus* e *B. pubescens* (ALMEIDA et al., 2016; KLEIZ et al., em prep.). Por fim, informações de genética populacional da espécie permanecem escassas, ainda que o acesso a essas informações e a manutenção de populações geneticamente viáveis sejam apontados como objetivos do plano nacional para a herpetofauna insular (BATAUS et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo objetivou acessar e caracterizar informações genéticas e genômicas de *Bothrops insularis*, a fim de contribuir com dados relevantes para sua conservação.

2.2. Objetivos específicos

Em decorrência da importância dos dados genéticos para a conservação da biodiversidade, o presente estudo teve como objetivos:

- (i) Testar um conjunto de microssatélites heterólogos desenvolvidos para três espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (*B. marmoratus*, *B. mattogrossensis* e *B. pauloensis*) em *B. insularis*;
- (ii) Caracterizar a diversidade genética das populações *ex situ* (do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan) e *in situ* de *B. insularis*, empregando o conjunto de microssatélites heterólogos testados no item i;
- (iii) Investigar a estruturação genética entre e dentre as populações;
- (iv) Obter e caracterizar o mitogenoma de *B. insularis*;
- (v) Comparar o mitogenoma de *B. insularis* com os mitogenomas disponíveis em banco de dados do gênero *Bothrops*;
- (vi) Realizar uma análise da composição dos mitogenomas de serpentes, sob um contexto filogenético;
- (vii) Obter e caracterizar o genoma completo de *B. insularis*;

- (viii) Realizar a prospecção de marcadores microssatélites específicos de *B. insularis*;
- (ix) Prover um conjunto de marcadores moleculares e de dados genéticos que possam ser empregados no programa de conservação para a espécie.

3. METODOLOGIA

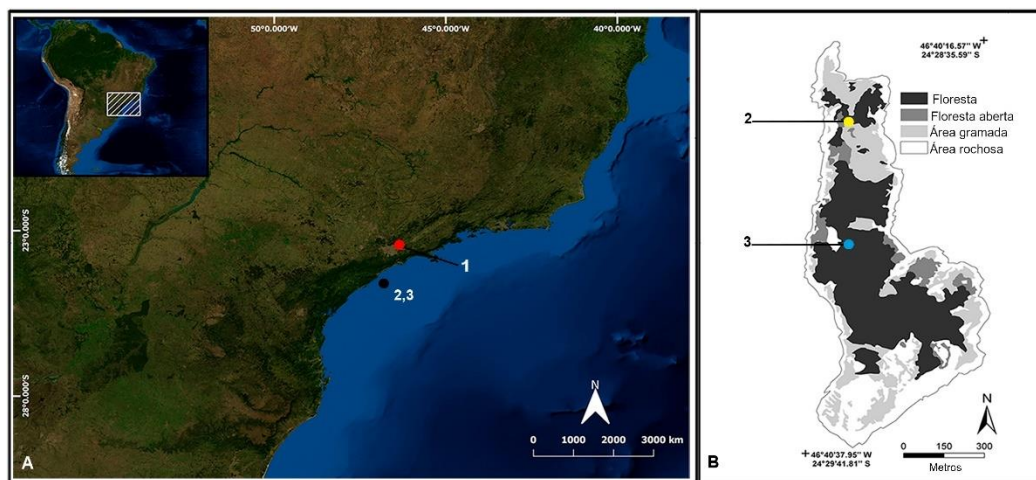
3.1. Coleta de amostras

Para as análises de genética de população um total de 80 amostras de tecido (escamas ventrais e/ou fígado) de espécimes de *B. insularis* foram utilizadas: 49 indivíduos da população *ex situ*, mantida no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV), do Instituto Butantan (estado de São Paulo, Brasil; ponto de amostragem #1; Fig. 2A; Apêndice 1) e 31 indivíduos da população *in situ* da Ilha da Queimada Grande (estado de São Paulo, Brasil; Fig. 2B; Apêndice 1), dos quais 12 são provenientes da área de amostragem #2 e 19 indivíduos da área de amostragem #3 (Fig. 2B). Devido a imprecisão dos dados de GPS na ilha, optou-se por usar a terminologia área de amostragem, para a qual o ponto centroide de cada área foi usado como a distribuição geográfica dos representantes da população *in situ*.

Para a realização da prospecção do mitogenoma e do genoma de *B. insularis*, amostras de escamas ventrais foram obtidas de três indivíduos: um macho (ID0002) da população *ex situ* e duas fêmeas (KB0016 e KB0028) da população *in situ*. Essas escamas foram acondicionadas em etanol P.A e levadas à geladeira até seu uso.

O projeto e a coleta de amostras foram realizados sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – nº 9813/12, CEUAIB – nº 3124270671/17 e CEUAIB – nº 15431705/18). As amostras da população *ex situ* foram doadas pela Dra. Selma M. A. dos Santos, e da população *in situ*, pelo Dr. Otavio A. V. Marques e Msc. Karina R. S. Banci.

Figura 2 - Áreas de amostragem das populações de *Bothrops insularis*. (A) Mapa topográfico com destaque para o estado de São Paulo, indicando as localizações das populações *ex situ* (1 – círculo vermelho) e *in situ* (2 e 3 – círculo preto). (B) Mapa de vegetação Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil – uso autorizado; indicando as áreas de amostragem (2 – círculo amarelo; 3 – círculo azul claro).



Fonte: Martins et al., 2008 – com modificações; Igor Salles de Oliveira.

3.2. Caracterização do genoma nuclear e do mitogenoma de *B. insularis*

3.2.1. Extração de DNA, construção de biblioteca e sequenciamento de nova geração

O DNA total foi extraído das amostras com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN), com as seguintes modificações: (i) uso de três escamas ventrais por indivíduo e (ii) adição de 20% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) durante a etapa de lise. Após a extração, o DNA foi purificado empregando o mix EXO/FAST (1,0 μ L de FastAP – *Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, 1U/ μ L, Thermofisher; 0,5 μ L de EXO – *Exonuclease I* de *Escherichia coli*, 20U/ μ L, Thermofisher), a fim de reduzir e eliminar contaminantes (resquícios de proteinases e reagentes usados durante a etapa de extração). A qualidade da solução obtida após extração foi aferida por meio dos parâmetros de 260/230 e 280/230 de cada uma das amostras, usando o Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas para um volume de 50 μ L com concentração variando de 30 a 50 ng/ μ L.

As amostras diluídas foram enviadas ao Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, no qual foi realizada a construção de uma biblioteca genômica enriquecida para cada indivíduo e posterior sequenciamento. As bibliotecas foram preparadas com o kit *Nextera DNA Flex Library Prep* seguindo as instruções do manual e o sequenciamento foi realizado em uma *lane* do sequenciador HiSeq2500 (leituras pareadas de 101 pb), usando o HiSeq SBS Kit v4.

3.2.2. Montagem do genoma nuclear e do mitogenoma de *B. insularis*

Após a obtenção dos dados de sequenciamento de cada indivíduo, as leituras foram repassadas aos pesquisadores Dr. José Salvatore Patané e Dr. Milton Yutaka Nishiyama Junior, do Núcleo de Bioinformática e Biologia Computacional do Instituto Butantan (NBBC), para que fossem realizadas as etapas de processamento, montagem e anotação do genoma e do mitogenoma de *B. insularis*, conforme descrito nos itens a seguir. O aluno acompanhou as análises de bioinformática referentes à montagem do genoma e do mitogenoma de *B. insularis* de forma indireta e participou diretamente das análises comparativas dos mitogenomas e da prospecção de marcadores microssatélites específicos para *B. insularis*.

3.2.2.1. Processamento dos reads

Dois arquivos *fatsq* foram gerados para cada indivíduo e armazenados na base de dados do ILLUMINA BASESPACE. Em seguida, esses arquivos foram avaliados por meio do programa ILLUMINA CASANOVA v.1.8.2, com parâmetro de QC \geq Q30 (QC: Controle de qualidade; Q30: Qualidade de 30%). Os conjuntos de sequências foram cortados e filtrados para (i) os contaminantes de *PhiX*, *Picchia pastoris* e *Escherichia coli*, usando o programa BOWTIE2 v.2.2.3 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) e (ii) por qualidade utilizando o programa TRIMMOMATIC v.0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Este último foi usado a fim de: (i) remover os adaptadores empregados no processo de sequenciamento e contaminantes contidos na base de dados UniVec (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/UniVec/>); (ii) cortar as extremidades 5' e 3' com qualidade média menor do que 25 (Phred+33); e (iii) descartar as sequências com tamanho menor que 30 pb após os cortes, usando os seguintes parâmetros: “ILLUMINACLIP:NextGenPrimerAdaptersUniVec.fa:2:30:10 LEADING:5 TRAILING:5 SLIDINGWINDOW:25:25 MINLEN:40 HEADCROP:0”.

3.2.2.2. Genoma nuclear de *B. insularis*

As estimativas de tamanho do genoma de *B. insularis* foram obtidas a partir das análises de câmeros (*k-mer*) das sequências processadas e o tamanho, calculadas usando a seguinte fórmula, descrita por Lander e Waterman (1988):

$$G = \frac{K_{num}}{K_{depth}} \quad (I)$$

Onde, K_{num} se refere ao número total de k -mer contados e K_{depth} se refere à cobertura dos k -mer. O perfil de k -mer foi gerado, por meio do software JELLYFISH v.2.2.6 (MARÇAIS; KINGSFORD, 2011), o qual calcula o número de k -mer e sua distribuição.

Essas estimativas foram geradas a partir de dois modelos. O primeiro assume uma distribuição de Poisson para os k -mers e, quando múltiplos picos são observados, o pico com menor frequência de k -mer é considerado um resultado de heterozigose. O segundo modelo, o qual é integrado no programa GENOMESCOPE, se refere a um modelo binomial misto negativo, garantindo uma maior flexibilidade para a estimativa do tamanho do genoma (VURTURE et al., 2017).

Foram adotadas duas metodologias de montagem para a obtenção do genoma de *B. insularis*: a montagem para cada um dos espécimes sequenciados e a montagem total do genoma (dados dos 3 espécimes em conjunto). A montagem do genoma foi avaliada a partir de diferentes montadores (ABYSS (SIMPSON et al., 2009), SOAPDenovo2 (LUO et al., 2012), MaSuRCA (ZIMIN et al., 2013), SPADES (PRJIBELSKI et al., 2020), Platanus (KAJITANI et al., 2019) e AllPaths-LG v.52488 (MACALLUM et al., 2009)) e considerando diferentes valores de câmeros (17, 25, 33, 51, 75). Além disso, foi realizado um segundo ciclo de extensão de *scaffolds* usando o SSPACE-Standard v.3 (BOETZER et al., 2011) e parâmetros (-x 0 -z 99 -m 335 -p 1 -v 1 -o 10 -g 1). Por fim, para a montagem do genoma total, os *gaps* entre os *scaffolds* foram preenchidos a partir do GapCloser do pacote SOAPDenovo2 com parâmetros padrões.

A integridade de cada genoma individual e do genoma total de *B. insularis* foi acessada a partir do software BUSCO (SIMÃO et al., 2015) por meio da busca de 3554 famílias proteicas altamente conservadas de genes em genomas eucariotos. A busca por elementos repetitivos e transponíveis no genoma de *B. insularis* foi realizada a partir do software RepeatMasker (TARAILO-GRAOVAC et al., 2009) utilizando a base de dados RepBase v. 20.05 (BAO et al., 2015).

3.2.2.3. Mitogenoma de *B. insularis*

As estimativas do tamanho do mitogenoma de *B. insularis* foram obtidas a partir dos mesmos métodos e programas empregados para a obtenção das estimativas do tamanho do genoma de *B. insularis*, apresentados no item 3.2.2.2.

Os dados provenientes do sequenciamento dos três representantes de *B. insularis* foram utilizados para a montagem do mitogenoma total de *B. insularis*. Duas metodologias foram empregadas: uma montagem *de novo* e uma a partir do mitogenoma de referência. Para a montagem *de novo*, as leituras foram emparelhadas para cada indivíduo de *B. insularis*, por meio do BOWTIE2, usando os parâmetros de “— *no-mixed – no-discordant*”. Em seguida, as sequências foram usadas para montar o mitogenoma a partir do “montador” ABYSS e parâmetro de *k-mer* = 75. Para montagem a partir do mitogenoma de referência, foram usados o programa CLC Genomics Workbench V.11.0.1 (QIAGEN, 2020) e o mitogenoma de *B. jararaca* (como referência), seguindo as etapas de (i) alinhamentos dos *reads* de *B. insularis* no mitogenoma de *B. jararaca* e (ii) a extração da sequência consenso dos alinhamentos dos *reads* usando o mitogenoma de *B. jararaca* como referência.

Para ambos os mitogenomas montados, a anotação foi realizada a partir do CLC Genomics Workbench V.11.0.1 módulo CLC “*Genome Finishing Module*” e opção “*Annotate from Reference*” usando o mitogenoma de *B. jararaca* como referência.

As estruturas secundárias das moléculas de RNA de transferência (tRNA) do mitogenoma de *B. insularis* foram previstas a partir dos *webservers* MITOS v.2 (DONATH et al., 2019) e tRNAScan v.2.0 (CHEN et al., em prep.). A estrutura do DNA mitocondrial foi desenhada utilizando o *webserver* CGViewer (STOTHARD; WISHART, 2005).

3.3. Revisão do mitogenoma de Serpentes

3.3.1. Obtenção de sequências

Foi realizada uma busca no banco de dados do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (do inglês *Nacional Center for Biotechnology Information*, NCBI; NCBI Resource Coordinators, 2016) com as palavras-chaves *mitochondrial + serpentes + complete* e/ou acessado o banco de dados de genomas de organelas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/organelles/Serpentes>) com filtro para “Serpentes”. Foram selecionadas sequências referenciadas, ou seja, que possuísem a identificação *RefSeq*; com exceção de casos em que a sequência fosse a única disponível. Foram utilizadas sequências depositadas até março de 2021 para que pudessem ser realizadas e finalizadas as análises. Ao final, 128 sequências de serpentes foram obtidas para o presente estudo (Apêndice 2).

3.3.2. Análise comparativa do mitogenoma de Serpentes do gênero *Bothrops*

O mitogenoma obtido de *B. insularis* foi comparado com três mitogenomas disponíveis no *GenBank* de espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*: *B. jararaca* (ALMEIDA et al., 2016), *B. diporus* e *B. pubescens* (KLEIZ, em prep). Os mitogenomas de cada espécie foram acessados utilizando o programa GENEIOUS v.7.1.7 (KAERSE et al., 2012), onde foram comparados quanto à estrutura e ordem gênica. A composição nucleotídica de cada mitogenoma foi aferida a partir do programa MEGA X (KUMAR et al., 2018). As curvas de inclinação CG e AT foram calculadas conforme descrição de Perna e Kocher (1995). Em seguida, os esquemas de cada molécula e a curva de inclinação CG foram desenhadas utilizando o *webserver* CGViewer. Por fim, os números de mutações sinônimas (MS) e não-sinônimas (MN) foram obtidos para cada gene em comparações par a par entre as espécies por meio do programa DnaSP v.6 (ROZAS et al., 2006). Esses parâmetros foram utilizados para a aferição da taxa de mutação sinônima (DS) e não-sinônima (DN), que foram usadas para a obtenção do índice de seleção (ω), conforme Sun et al. (2018).

3.3.3. Análise comparativa dos mitogenomas de Serpentes

Os mitogenomas de Serpentes foram obtidos por meio do NCBI e acessados utilizando o programa GENEIOUS; porém, foi observada a existência de regiões não anotadas em muitos genomas. Logo, cada região não-anotada foi extraída e analisada a partir de dois métodos: (i) comparação de cada uma das regiões com os tRNAs de cada uma das espécies analisadas a partir da função *map to reference* implementada no programa GENEIOUS; e (ii) comparação de cada região a sequências existentes no banco de dados do NCBI (banco de dados: NT/NR; TSA; RefSeq RNA; e HTGS) e o Recurso Universal de Proteínas (do inglês *Universal Resource Proteins* – UNIPROT; THE UNIPROT CONSORTIUM, 2019). Após a análise, regiões recuperadas com mais de 50% de similaridade foram identificadas como prováveis componentes dos mitogenomas analisados, e utilizadas nas análises comparativas. Por fim, os mitogenomas foram comparados quanto a sua estrutura e ordem gênica.

3.3.4. Reconstrução filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas a partir de uma matriz composta por 13 genes que codificam para proteínas e duas subunidades do rRNA de 129 sequências de mitogenomas de Serpentes (128 disponíveis no banco de dados do NCBI e o mitogenoma de *B. insularis*),

resultando em 14.929 pb. Com base em revisões anteriores (ver QIAN et al., 2018) e na compilação das relações filogenéticas do clado Squamata, obtida no site *ReptiliaDatabase* (UETZ et al., 2021), foram selecionadas seis sequências para compor o grupo externo, relativas aos seguintes organismos: *Chelodina oblonga* (NC037387), *Crocodylus acutus* (NC015647), *Plestiodon egregius* (NC000888), *Varanus salvator* (NC010974), *Chamaeleo chamaeleon* (NC012427) e *Iguana iguana* (NC002793).

As sequências dos genes respiratórios e os rRNAs foram separadas por meio do programa GENEIOUS v.7.1.7, e alinhadas no ALIVIEW (LARSSON, 2014) usando o algoritmo de alinhamento Muscle (EDGAR, 2004). Os alinhamentos foram checados cuidadosamente de forma manual para evitar e corrigir possíveis erros. Cada alinhamento foi particionado em uma matriz única com base na posição do códon por meio do FASPARSER v.2.10.0 (YAN-BO, 2018). Em seguida, as matrizes únicas foram concatenadas e estimadas as partições dentro da supermatriz gerada a partir do programa FASCONCAT.PL (KÜCK; MEUSEMANN, 2010). Por fim, o modelo evolutivo de cada uma das partições foi inferido a partir do complemento MODELFINDER (KALYAANAMOORTHY et al., 2017), implementado no IQTREE v.1.6.12 (NGUYEN et al., 2015).

As árvores filogenéticas foram reconstruídas empregando o método de máxima verossimilhança (do inglês *Maximum Likelihood* - ML) e o método de Inferência Bayesiana (do inglês *Bayesian Inference* – BI). O método de ML foi implementado utilizando o IQTREE v.1.6.12, empregando os modelos evolutivos e partições obtidas no MODELFINDER (Apêndice 3), *seed* 12345 e 1.000 replicações rápidas de *bootstrap* para a obtenção dos valores de suporte. O método de BI foi implementado utilizando o MRBAYES v.3.1.2 (RONQUIST et al., 2012) adaptando-se os modelos evolutivos obtidos no MODELFINDER (Apêndice 4). Anteriormente às análises, o parâmetro de *prior dirichlet* foi calculado conforme descrito no manual do MRBAYES, utilizando o pacote APE (PARADIS; SCHLIEP, 2019) implementado no R (R CORE TEAM, 2021) para acessar o tamanho da árvore inicial, o tamanho dos ramos internos e o tamanho dos ramos externos. Por fim, as análises foram realizadas com parâmetros de 20.000.000 de gerações em duas corridas de 4 cadeias de Markov (MCMC), amostradas a cada 1.000 gerações, com *burn-in* de 30%. A convergência dos parâmetros Bayesianos foi investigada a partir do *software* TRACER v.1.7.1. As árvores obtidas foram visualizadas por meio do FIGTREE v.1.4.3 (RAMBAUT et al., 2018)

3.4. Prospecção de microssatélites específicos de *B. insularis*

O genoma total obtido para *B. insularis* foi utilizado para realizar a prospecção de marcadores microssatélites específicos a partir do programa KRAIT v.1.3.3 (DU et al., 2018). A primeira etapa consistiu na leitura do arquivo do genoma total e predição dos possíveis marcadores microssatélites perfeitos, cuja busca foi realizada com os seguintes parâmetros: Mínimo de repetições: Mono = 99, Di = 49, Tri = 33, Tetra = 25, Penta = 20, Hexa = 16; Nível de padronização de motivos: Level 3. A segunda etapa consistiu na seleção de potenciais sequências acima de 150 pb de tamanho, uma vez que a leitura de fragmentos abaixo de 150 pb apresenta menor precisão durante a análise de fragmentos de microssatélites. A terceira etapa consistiu no desenho dos *primers* para as sequências obtidas na etapa 2, a partir do algoritmo Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) empregado no Krait com parâmetros: 100 – 500 pb de produto; tamanho do *primer*: 18 – 25pb, com tamanho ideal 20pb; porcentagem GC no *primer*: 40 a 60 %; temperatura de anelamento: 57 – 65°C, com temperatura média 60°C. A quarta etapa consistiu na seleção de sequências de motivo único, a qual foi realizada manualmente e teve como objetivo remover redundâncias e eliminar possíveis minissatélites e elementos transponíveis. Por fim, os dados obtidos na terceira e quarta etapa foram sobrepostos para a obtenção dos *primers* dos potenciais microssatélites específicos de *B. insularis*.

3.5. Genética de população de *B. insularis*

3.5.1. Amplificação e genotipagem de microssatélites heterólogos

O DNA genômico foi extraído de escama ventral ou fígado, de acordo com o protocolo de extração de Walsh, Metzger e Higuchi (1991). Trinta e três pares de *primers* desenvolvidos por Machado (2015) para três espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (*B. marmoratus* – Bmar; *B. mattogrossensis* – Bmat; e *B. pauloensis* – Bpau) foram testados e usados para a amplificação de sequências de DNA das amostras de *B. insularis* (Anexo 1). As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 15 µL distribuídos em: 3,993 µL de água Milli-Q, 1,5 µL de tampão de PCR 10x, 0,45 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂/50 mM), 0,282 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs/ 5mM), 0,4 µL de *primers forward* com cauda M13 (1 mM), 0,4 µL de *primers reverse* (10 mM), 0,4 µL de *primer* M13 (FAM-, NED-, PET-, ou VIC-; 10 mM), 0,075 µL de Taq Platinum polimerase (1U/µL; Invitrogen), e 7,5 µL de DNA sob concentração de 60 ng/µL. As reações foram realizadas no termociclador LifeEco Bioer Thermocycler, como descrito por Machado (2015), porém com tempo da etapa de anelamento

(hibridização) reduzido para 45 e 30 segundos nos ciclos de *touchdown* (ciclos de redução da temperatura) e normais (temperatura fixa), respectivamente. Análise de fragmentos de microsatélites foi realizada a partir de um sequenciador capilar (Prism 3730XL Genetic Analyzer; Applied Biosystems) no “Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano”, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (IB-USP). Cada fragmento de microsatélite foi aferido com o programa GENEIOUS v.7.1.7 (KAERSE et al., 2012).

3.5.2. Análises genéticas populacionais

Detalhes e o *script* utilizado para as análises genéticas realizadas no programa R v.3.5.1 (R CORE TEAM, 2021) foram disponibilizados nos Apêndices 5 e 6. As seções a seguir focarão na descrição dos parâmetros, pacotes e programas utilizados para realizar as análises. O valor crítico de probabilidade (do inglês *Critical probability value – p-value*/ $p \leq 0,05$) para todos os testes descritos foram ajustados segundo o fator de correção de Bonferroni (RICE, 1989).

3.5.2.1. Controle de qualidade, teste de desequilíbrio de ligação e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg

Porcentagens de *missing data* foram obtidas por meio do pacote POPPR v.2.8.1 (KAMVAR; TABIMA; GRUNWALD, 2014; KAMVAR; BROOKS; GRUNWALD, 2015). Locus e indivíduos com mais de 30% de *missing data* foram excluídos das análises. A ocorrência de alelos nulos e picos falsos (*shuttering*) foram investigados por meio do programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (VANOOSTERHOUT et al., 2004). Testes de desequilíbrio de ligação foram realizados par-a-par para cada população e para uma matriz contendo todos os dados, utilizando o pacote ADEGENET v.2.1.1 (JOMBART, 2008). O teste de equilíbrio de Hardy–Weinberg (HWE) foi realizado no pacote PEGAS v.0.11 (PARADIS, 2010) com 1.000 permutações.

3.5.2.2. Índices de diversidade genética

O número de alelos (A) e o número de alelos privados (PA) foram calculados no POPPR. O índice de riqueza alélica foi obtido usando o pacote HIERFSTAT v.0.44-22 (GOUDET, 2005). Adicionalmente, os índices de heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) foram inferidos a partir do pacote básico implementado no R.

3.5.2.3. Índices de endocruzamento

Dois índices de endocruzamento, com significados biológicos diferentes, são conhecidos na literatura: o coeficiente de endocruzamento (F_{is}) avalia o sistema de cruzamento da população, e o coeficiente de endocruzamento de genograma ou por parentesco (f_{is}) acessa a probabilidade de o indivíduo exibir um alelo que seja idêntico por descendência (IBD) devido a relações parentais (TEMPLETON, 2011).

Dado que ambos os coeficientes trazem informações distintas e importantes para a conservação, investigamos o coeficiente de endocruzamento de sistema de acasalamento (F_{is}) usando o programa FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e a média individual do coeficiente de endocruzamento por parentesco (f_{is}) de cada população a partir do pacote ADEGENET. A significância de cada índice foi obtida a partir do método de *bootstrap* com 1.000 permutações.

3.5.2.4. Efeito gargalo

O programa Bottleneck (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999) foi usado para a inferência de reduções demográficas recentes na população *in situ*. A análise foi realizada com 1.000 interações sob 2 modelos: (a) o modelo de alelo infinito (do inglês *infinite allele model* – IAM); e (ii) o modelo de mutação gradual (do inglês *Stepwise mutation model* – SMM) a partir dos testes de “*Sign up*” e de Wilcoxon.

3.5.2.5. Estruturação genética populacional

A fim de evitar erros, indivíduos nascidos na população *ex situ* foram excluídos das análises de diferenciação e estruturação populacional.

Os coeficientes de diferenciação populacional são divididos em três classes: (i) o coeficiente de Wright - F_{st} , (ii) os análogos padronizados do F_{st} , e (iii) os coeficientes baseados na diferença das composições alélicas das populações - D_{est} de Jost. Embora esses índices sejam considerados motivo de controvérsia, a combinação deles pode aumentar a acurácia das tentativas de elucidar estruturas demográficas e genéticas das populações (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). O índice de diferenciação de Wright (F_{st}) foi calculado usando o programa FSTAT. Os índices de diferenciação de Hendrick (G_{st}') e de Jost (D_{est}) foram obtidos usando o pacote MMOD (WINTER, 2012). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada a

partir do pacote POPPR. O valor de significância de todos os índices e dos resultados do AMOVA foram obtidos usando o método de *bootstrap* com 1.000 permutações.

A estrutura genética dentro e entre populações foi analisada por meio de duas abordagens: (i) o método de agrupamento Bayesiano aplicado no programa STRUCTURE v.2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), e (ii) o método de análise discriminante de componentes principais (do inglês *Discriminant Analysis of Principal Components* - DAPC; JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010), implementado no pacote ADEGENET v.2.1.1 (JOMBART, 2008).

As análises no STRUCTURE foram conduzidas sem uma origem *a priori* e testando um modelo de mistura. Inicialmente, foram realizadas 10 corridas para um único agrupamento a fim de determinar qual o melhor modelo alélico a ser empregado nas análises, bem como o valor inicial de *lambda* (λ) (PORRAS-HURTADO *et al.*, 2013; JANES *et al.*, 2017). Em seguida, foi investigada a probabilidade de diferentes números de agrupamentos (K) de um a seis, com *burn-in* de 500.000, seguido por cadeias de Markov Monte Carlo (do inglês *Markov Chain Monte Carlo* - MCMC) de 1000000 gerações, repetidos 30 vezes. O número de agrupamentos mais provável foi investigado a partir da comparação entre: (i) o valor médio do parâmetro *alfa* (α) das 30 corridas obtidas para cada K; (ii) a simetria da distribuição da probabilidade de filiação dos indivíduos para cada agrupamento em cada gráfico gerado para cada K; (iii) o K obtido pelo método de probabilidade de *likelihood* (Prob (Ln|K)), e (iv) o K obtido pelo método de Evanno (EVANNO *et al.*, 2005), realizado no programa STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012). Os dados obtidos foram resumidos usando o programa CLUMPP v.1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e visualizados no programa DISTRUCT v.1.1 (ROSENBERG, 2004).

Para as análises de DAPC, o número de agrupamentos (K) foi estimado entre um e dez usando o menor valor do Critério de Informação Bayesiana (do inglês *Bayesian Information Criterion* - BIC) retendo 30 componentes principais (CP, do inglês *principal components*), usando o ADEGENET. O número de possíveis agrupamentos foi elevado para dez para melhorar a visualização do gráfico obtido para os valores de BIC. Subsequentemente, análises iniciais foram realizadas com parâmetros de 25 CP, três discriminantes principais e assumindo um número K de agrupamentos obtidos no passo anterior. Uma vez que o excesso de CP pode influenciar e levar a erros nos resultados, o número correto de CP para as análises foi acessado a partir do método de pontuação alfa (α -scored) no pacote ADEGENET.

3.5.3. Manejo genético e reprodutivo da população *ex situ* mantida no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan

O coeficiente de parentesco foi obtido para 37 indivíduos cativos no LEEV, dos quais 34 ainda estavam vivos ao final desse estudo, a partir do programa ML-RELATE (KALINOWSKII; WAGNER; TAPER, 2006). Com base nesses valores, foram analisados: (i) o grau de parentesco entre cada par de indivíduos capaz de se reproduzir, segundo Wang (2011), e (ii) dois casos de incertezas de parentesco nas populações cativas. O primeiro caso de incerteza de paternidade se referia a dois possíveis pais (ID0001 e ID011F) e três descendentes (ID06FF, ID08FF e ID09FF); e um segundo caso relacionado a incertezas de maternidade entre fêmeas fundadoras e cinco descendentes (ID011F, ID013F, ID014F, ID015F e ID021F).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do genoma e do mitogenoma de *B. insularis*

4.1.1. Análise bioinformática dos dados obtidos a partir do sequenciamento

4.1.1.1. Controle de qualidade e seleção dos reads para a montagem do genoma e mitogenoma de *B. insularis*

O sequenciamento dos três genomas individuais de *B. insularis* a partir do sequenciamento de nova geração gerou entre 78.715.993 e 87.713.676 leituras pareadas. Dessas, cerca de 6.726.168 a 8.707.218 leituras foram removidas devido a presença de contaminantes, a baixa qualidade ou tamanho menor que 30 pb após o corte. Apesar da necessidade de remoção de leituras específicas, a qualidade média das bases sequenciadas se manteve excelente, com a maior parte das 101 bases sequenciadas por *reads* com qualidade (Q)>34. Por fim, ao final da triagem de qualidade, cerca de 71.795.254 a 80.987.508 leituras de alta qualidade foram obtidas para cada indivíduo.

4.1.1.2. Genoma de *B. insularis* v. 1.0

Após os testes para a identificação do montador mais adequado ao conjunto de dados obtidos do sequenciamento, a montagem do genoma de cada espécime de *B. insularis* foi realizada a partir do *software* SOAPDenovo com parâmetros -K 41 e -K 63, seguido de uma segunda etapa de *scaffolding* usando o SSPACE. O processo resultou na obtenção de *scaffolds*

de tamanho total médios de 1,5Gpb para cada indivíduo, com N50 relativo aos *scaffolds* de 4.713Kpb, 5.111Kpb e 3.829 Kpb para cada indivíduo, respectivamente (Tabela 1).

Para a montagem do genoma total, todas as leituras obtidas de cada indivíduo foram usadas, bem como o *software* SOAPDenovo, seguido do SSPACE. Os gaps nos *scaffolds* foram preenchidos usando o GapCloser com parâmetros padrões. Dessa forma, cerca de 233 milhões de leituras pareadas foram usadas, representando uma profundidade de cobertura de 20X. A partir das análises de *k-mers*, foi estimado o tamanho entre 2,348 e 2,367 Gpb para o genoma de *B. insularis*. A montagem do genoma total resultou na obtenção de *scaffolds* de tamanho total de 1,5 Gpb, correspondendo a um total de 67.8 % do genoma predito, com N50 relativo aos *scaffolds* de 7.359 Kpb (Tabela 1).

A integridade das versões de genoma (individuais) e total obtido foram acessadas a partir do *software* BUSCO, conforme descrito no item 3.2.2.2 da metodologia. As análises iniciais referentes à avaliação da integridade dos genomas individuais mostraram uma baixa confiabilidade nos genomas recuperados de forma separada, justificando dessa forma a escolha do uso de todos as leituras obtidas em conjunto, e a montagem de um genoma total para as análises. Com o BUSCO aplicado à montagem do genoma total, dos 3354 grupos ortólogos procurados, foram identificados 1295 (38.6 %) genes completos (cópias únicas e duplicadas), 903 (26.9 %) de genes fragmentados e 1.156 (34.5%) de genes não foram recuperados.

Outra análise importante quanto à anotação genômica é a identificação e busca de elementos repetitivos e transponíveis, uma vez que um dos objetivos do projeto foi a prospecção de marcadores microssatélites específicos (marcador relacionado à região repetitiva). Em média, para cada genoma individual foi recuperada uma porcentagem de 5% do genoma como elementos repetitivos e/ou transponíveis. Para o genoma total, foi recuperada uma porcentagem de 9% do genoma como elementos repetitivos e/ou transponíveis. Nesse último caso, predominaram os retroelementos (5.87%), dentre os quais, os LINEs (elementos nucleares longos intercalados) são predominantes (5.27%). Destaca-se que regiões satélites e de repetições simples, as quais podem estar associadas a regiões de microssatélites, correspondem a 0.01 e 2.62% dos elementos preditos.

Tabela 1 - Dados relativos à montagem dos genomas individuais e total de *B. insularis*.

	ISOA	ISOB	ISOC	Total
Leituras iniciais	87713676	89371397	78715493	255800566
Leituras finais	80987508	80664179	71795254	233446941
Método de montagem do genoma	SOAPdeNovo + SSPACE	SOAPdeNovo + SSPACE	SOAPdeNovo+ SSPACE	SOAPdeNovo + SSPACE + GapCloser
Número de scaffolds	919324	859434	1026159	900515
Tamanho total os scaffolds (pb)	1535358826	1548987658	1478132556	1559466890
Scaffold mais longo (pb)	71242	71807	54923	169224
Scaffold mais curto (pb)	100	100	100	100
N50	4713	5111	3829	7359
L50	87152	83322	105783	55543
Número de contigs	3434167	3430524	3607742	1050000
Tamanho total de contigs (pb)	103264745	10483262118	963057894	1538116826
Contig mais longo (pb)	8227	7729	8262	93360
Contig mais curto (pb)	43	39	43	43
N50	436	440	340	6143
L50	652352	669547	780171	3067
Profundidade de cobertura	-	-	-	20 X
Cobertura (%)	63,48	64,3	60,43	67,8

4.1.1.3. Mitogenoma de *B. insularis*

A partir das análises de *k-mers*, foi estimado o tamanho entre 18.483 e 18.721pb para o mitogenoma de *B. insularis*. Após o processo de montagem do mitogenoma foram obtidas: (i) uma molécula de 16.606pb para a montagem *de novo* (Apêndice 7); e (ii) uma molécula de 17.523pb para a montagem a partir de um genoma de referência (*B. jararaca*). As duas montagens divergem pela presença de uma sequência de cerca de 900 pb, caracterizada como região controle I, recuperada somente por meio da montagem a partir do genoma de referência. Apesar das duas montagens, aquela obtida a partir do mitogenoma de referência foi selecionada, uma vez que nela foi recuperada a região controle I, observada em todas as outras espécies de Viperidae. Além disso, a alta similaridade entre as regiões controle I e II, cerca de 98%, pode ter dificultado a montagem *de novo*. As anotações do mitogenoma de *B. jararaca* foram transpassadas ao de *B. insularis*, com grau de identidade para cada região variando de 0,94 a 1 (Apêndices 8 e 9).

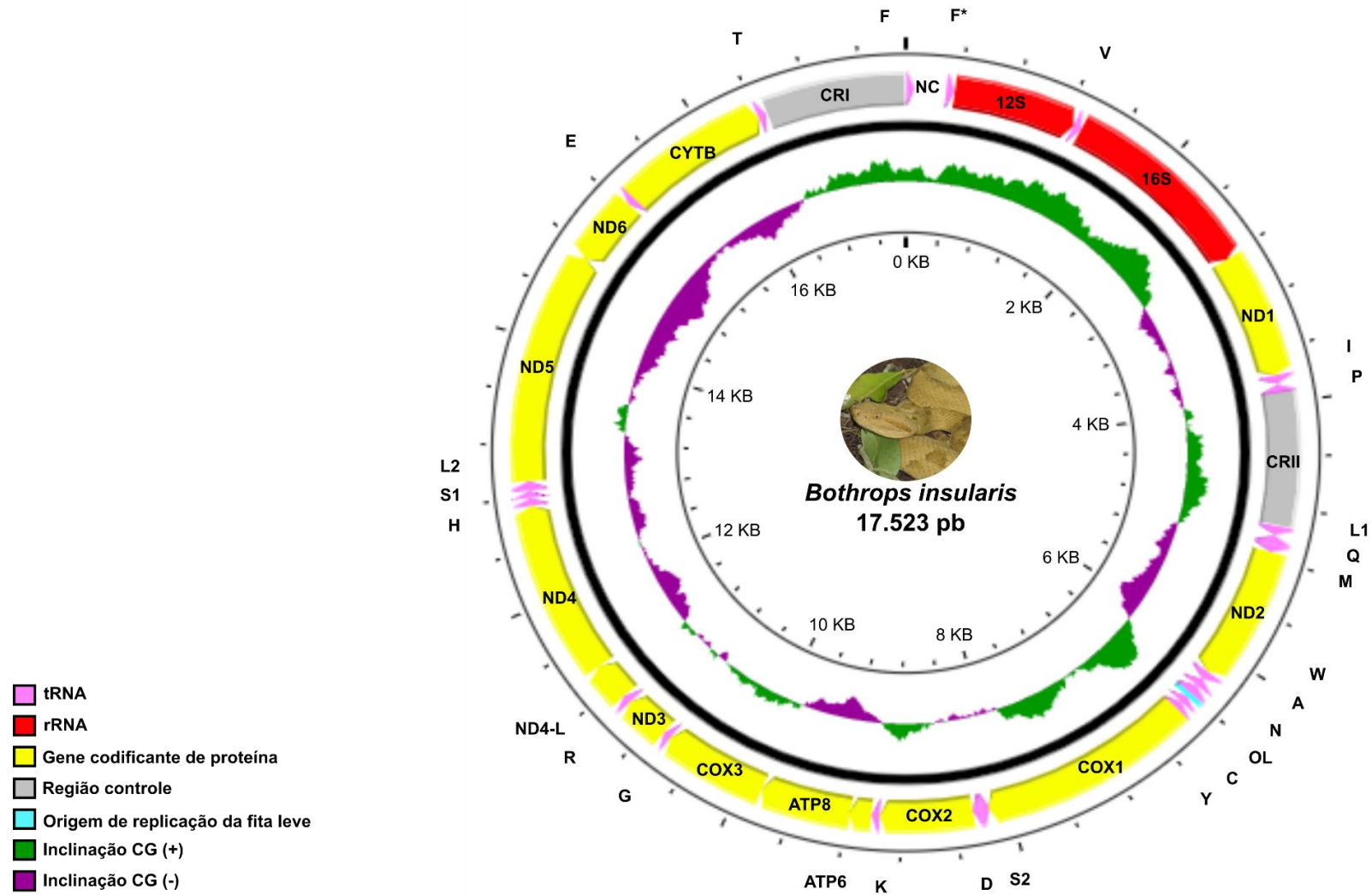
Dessa forma, o mitogenoma de *B. insularis* foi recuperado como uma molécula circular de 17.523pb (Fig. 3; Tabela 2), composta por 13 genes codificantes de proteínas respiratórias (PCG), 23 RNAs de transferência (tRNA), duas regiões controle (CR), dois RNAs ribossômicos

(rRNA), uma origem de replicação da fita leve (do inglês *light strand replication origin* - OL) e uma região não codificante; 28 componentes gênicos são codificados a partir da fita pesada (do inglês *heavy* – H ou +) e nove são codificados a partir da fita leve (do inglês *light* – L ou -).

Dos 23 tRNAs recuperados (Fig. 4), 21 são relacionados a diferentes tipos de tRNA, enquanto 2 se relacionam ao tRNA-fenilalanina (tRNA-Phe ou F). A estrutura secundária de ambos tRNA-Phe são altamente similares entre si (83.1%), porém, divergem devido à ausência do braço do caule-alça TΨC.

Por fim, outra região recuperada foi uma região não codificante entre os dois tRNA-Phe. Análises de alinhamentos básicos locais (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool – blast*) sugerem que essa região apresenta alta similaridade com segmentos das regiões controle de *B. jararaca*.

Figura 3 - Diagrama do mitogenoma de *Bothrops insularis*.



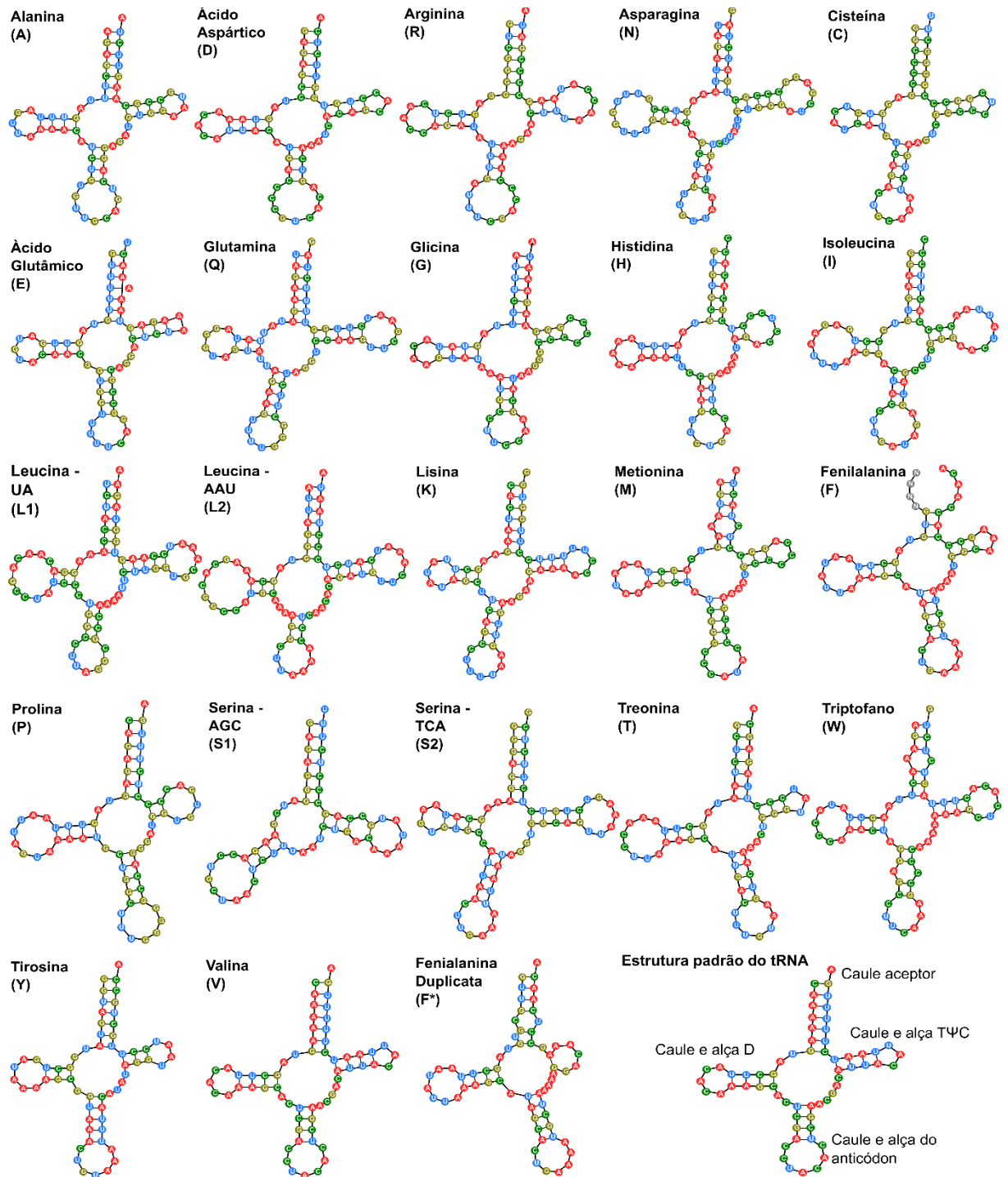
Fonte: Igor Salles de Oliveira.

Tabela 2 - Organização gênica do mitogenoma de *Bothrops insularis*.

Característica	Posição	Tamanho (pb)	Codon		tRNA	Fita
			Começo	Fim	Anticodon	
tRNA-Phe (F)	6 – 65	60			GAA	+
tRNA-Phe (F*)	299 – 362	64			GAA	+
12S	363 – 1279	917				+
tRNA-Val (V)	1280 – 1342	63			UAC	+
16S	1343 – 2822	1480				+
ND1	2823 – 3783	961	ATA	T		+
tRNA-Ile (I)	3784 – 3852	69			GAU	+
tRNA-Pro (P)	3853 – 3920	65			UGG	-
Região Controle II (CRII)	3906 – 4938	1033				+
tRNA-Leu ^{UAA} (L1)	4946 – 5018	73			UAA	+
tRNA-Gln (Q)	5019 – 5088	70			UUG	-
tRNA-Met (M)	5089 – 5151	63			CAU	+
ND2	5152 – 6181	1030	ATT	T		+
tRNA-Trp (W)	6182 – 6249	68			UCA	+
tRNA-Ala (A)	6250 – 6313	64			UGC	-
tRNA-Asn (N)	6314 – 6388	75			GUU	-
Origem de replicação da fita leve (O _L)	6391 – 6425	35				-
tRNA-Cys (C)	6424 – 6483	60			GCA	-
tRNA-Tyr (Y)	6484 – 6544	61			GUA	-
COX1	6546 – 8147	1602	GTG	AGA		+
tRNA-Ser ^{UGA} (S2)	8138 – 8205	68			UGA	-
tRNA-Asp (D)	8206 – 8268	63			GUC	+
COX2	8269 – 8953	685	ATG	T		+
tRNA-Lys (K)	8954 – 9016	63			UUU	+
ATP8	9017 – 9181	165	ATG	TAA		+
ATP6	9172 – 9852	681	ATG	TAA		+
COX3	9852 – 10635	784	ATG	T		+
tRNA-Gly (G)	10636 – 10696	61			UCC	+
ND3	10697 – 11039	343	ATC	T		+
tRNA-Arg (R)	11040 – 11104	65			UCG	+
ND4-L	11105 – 11395	291	ATG	TAA		+
ND4	11395 – 12732	1338	ATG	AGA		+
tRNA-His (H)	12734 – 12795	62			GUG	+
tRNA-Ser ^{GCU} (S1)	12796 – 12851	56			GCU	+
tRNA-Leu ^{UAG} (L2)	12852 – 12924	73			UAG	+
ND5	12925 – 14712	1788	ATG	TAA		+
ND6	14708 – 15229	522	ATG	AGA		-
tRNA-Glu (E)	15231 – 15293	63			UUC	-
CYTB	15293 – 16406	1114	ATG	T		+
tRNA-Thr (T)	16407 – 16470	64			UGU	+
Região Controle I (CRI)	16471 – 17523	1030				+

Nota: (+) = fita pesada. (-) = fita leve.

Figura 4 - Estrutura secundária dos tRNA preditos para *B. insularis*. Note a ausência do caule (braço) na duplicata do tRNA-Phe (F*) em comparação a presença do caule (braço) no tRNA-Phe (F).



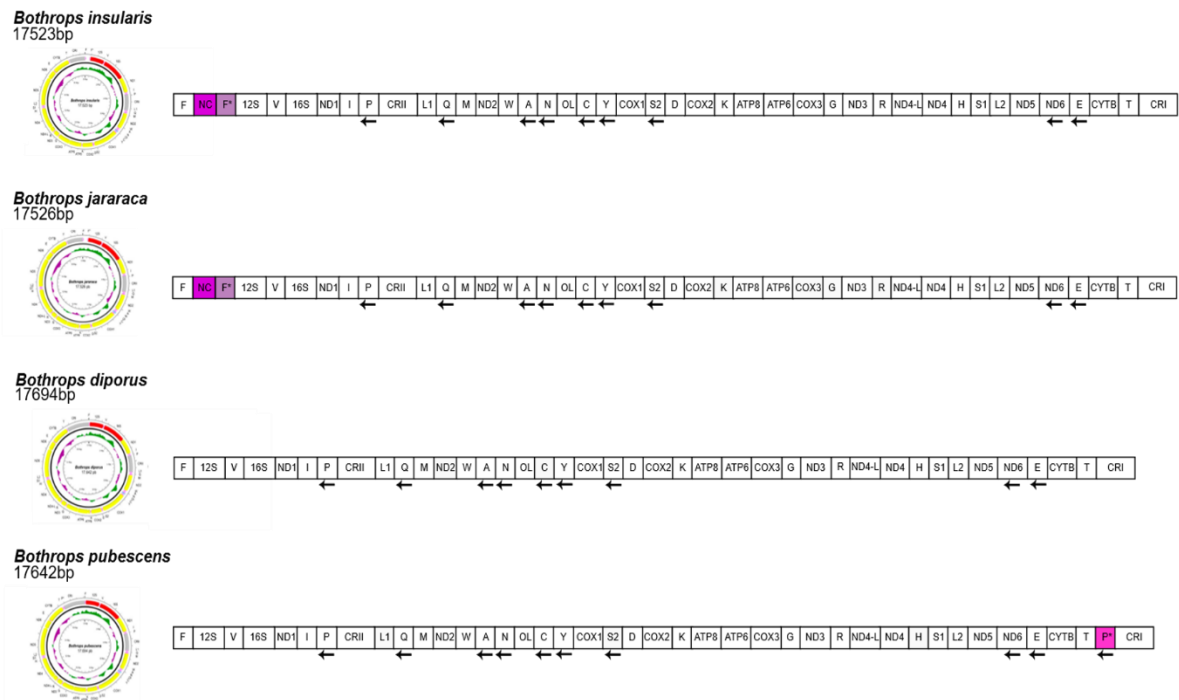
Fonte: Igor Salles de Oliveira.

4.2. Mitogenoma de Serpentes

4.2.1. Comparação do mitogenoma de Serpentes do gênero *Bothrops*

Análises comparativas do ponto de vista estrutural entre os mitogenomas de *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. pubescens* sugerem uma distribuição altamente conservada dos elementos gênicos na estrutura dessas moléculas (Fig. 5). No entanto, apesar das similaridades, é possível observar algumas divergências.

Figura 5 - Representação gráfica dos mitogenomas de espécies do gênero *Bothrops*: *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. pubescens*. Além da representação circular em miniatura, um diagrama linear foi desenhado para cada uma das espécies a fim de auxiliar na visualização e compreensão das divergências estruturais. Componentes gênicos que divergem entre as espécies estão destacados pelas cores: rosa escuro = região não codificante; lilás = duplicata do tRNA-Phe (F*); rosa fluorescente = duplicata do tRNA-Prolina (P*).



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

B. insularis e *B. jararaca* fazem parte do complexo de espécies denominado *Bothrops* do grupo *jararaca*, e ambas as espécies apresentam a mesma estrutura e distribuição de elementos gênicos no mitogenoma. Esses mitogenomas são caracterizados pela presença de uma região não codificante seguida de uma duplicata do tRNA-Phe (F*) entre o tRNA-Phe (F) e a subunidade 12S do rRNA mitocondrial.

B. diporus e *B. pubescens* fazem parte do complexo de espécies denominado *Bothrops* do grupo *neuwiedi* e ambas as espécies apresentam estruturas do mitogenoma e distribuição de

elementos gênicos distintos entre si e entre as espécies pertencentes ao complexo *Bothrops* do grupo *jararaca*. O mitogenoma de *B. diporus* é caracterizado pela presença do tRNA-Prolina (tRNA-Pro ou P) entre o tRNA-Isoleucina (tRNA-Ile ou I) e a região controle II (CRII). O mitogenoma de *B. pubescens* é caracterizado pela presença de uma duplicata do tRNA-Pro (P*) entre o tRNA-Treonina (tRNA-Thr ou T) e a região controle I (CRI).

Foi observada uma alta similaridade de composição nucleotídica entre as espécies do gênero *Bothrops*, a qual se relaciona com a distância genética obtida entre as espécies (Tabela 3). O mitogenoma de *B. insularis* é mais parecido com o de *B. jararaca* (98,5%), o que reflete a distância genética entre essas espécies (0,02). O mitogenoma de *B. diporus* é mais parecido com o de *B. pubescens* (98,4%) o que reflete a distância genética entre essas espécies (0,01). Além disso, vale ressaltar que a composição nucleotídica entre as quatro espécies é conservada (Tabela 4), com a presença de pequenas divergências (cerca de 0,1 – 0,5) envolvendo três bases (Adenina, Guanina, Timina), o que reflete nas curvas de inclinação AT e GC (AT_{inclinação} e GC_{inclinação}).

Tabela 3 - Distância genética e similaridade nucleotídica entre as espécies do gênero *Bothrops*: *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. pubescens*.

	<i>B. insularis</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. diporus</i>	<i>B. pubescens</i>
<i>B. insularis</i>	-	98,5%	88,8%	88,3%
<i>B. jararaca</i>	0,02	-	87,3%	86,9%
<i>B. diporus</i>	0,10	0,10	-	98,4%
<i>B. pubescens</i>	0,10	0,11	0,01	-

Nota: Diagonal inferior = Distâncias genética; Diagonal superior = Similaridade entre os mitogenomas.

Tabela 4 - Composição nucleotídica das espécies do gênero *Bothrops*: *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. pubescens*.

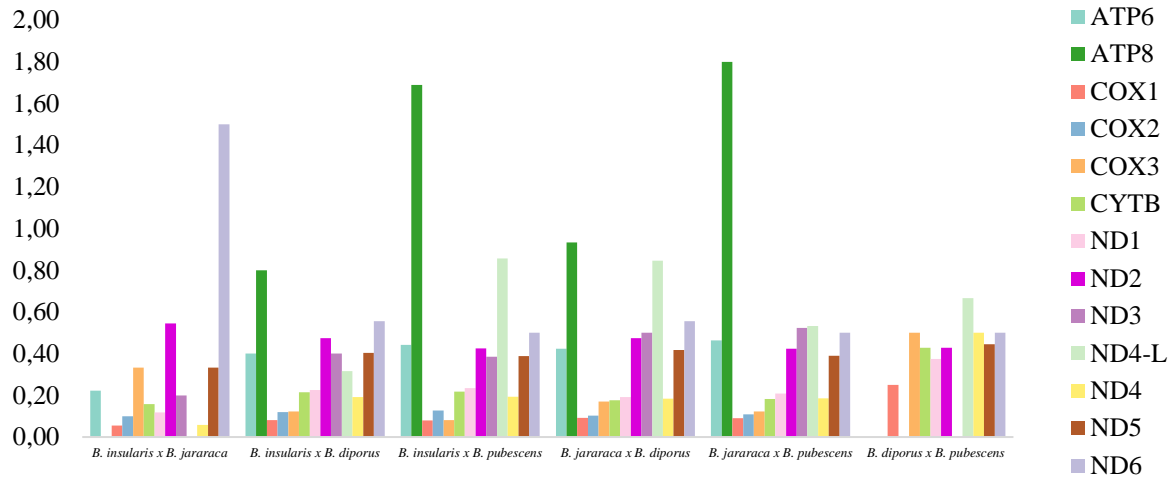
Species	A	T	C	G	AT	CG	AT _{inclinação}	CG _{inclinação}
<i>B. insularis</i>	31,9	24,4	30,3	13,3	56,3	43,6	0,13	0,39
<i>B. jararaca</i>	31,9	24,5	30,3	13,3	56,4	43,6	0,13	0,39
<i>B. diporus</i>	31,5	24,6	30,3	13,6	56,1	43,9	0,12	0,38
<i>B. pubescens</i>	31,5	24,6	30,3	13,6	56,1	43,9	0,12	0,38

Nota: (A) = Adenina; (C) = Citosina; (G) Guanina; (T) Timina.

Padrões evolutivos entre os mitogenomas das espécies de *Bothrops* foram estimados a partir do índice de seleção (ω ou DN/DS), aferido para cada um dos PCG para cada par de espécies (Fig. 6). De modo geral, todos os PCG evoluem sob uma pressão seletiva purificadora ($\omega < 1$), porém sinais de seleção positiva ($\omega > 1$) foram observadas a depender do par analisado: (i) o gene ATP8 apresentou sinais de seleção positiva quando *B. pubescens* foi comparada às espécies pertencentes ao complexo *Bothrops* do grupo *jararaca* (*B. pubescens* x *B. insularis*:

$\omega = 1,69$; *B. pubescens* x *B. jararaca*: $\omega = 1,80$); e (ii) o gene ND6 apresentou sinal de seleção positiva quando *B. insularis* e *B. jararaca* foram comparadas entre si ($\omega = 1,50$).

Figura 6 - Índice de seleção (ω) para cada gene codificante de proteína entre as espécies do gênero *Bothrops*.



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

4.2.2. Evolução do mitogenoma de Serpentes

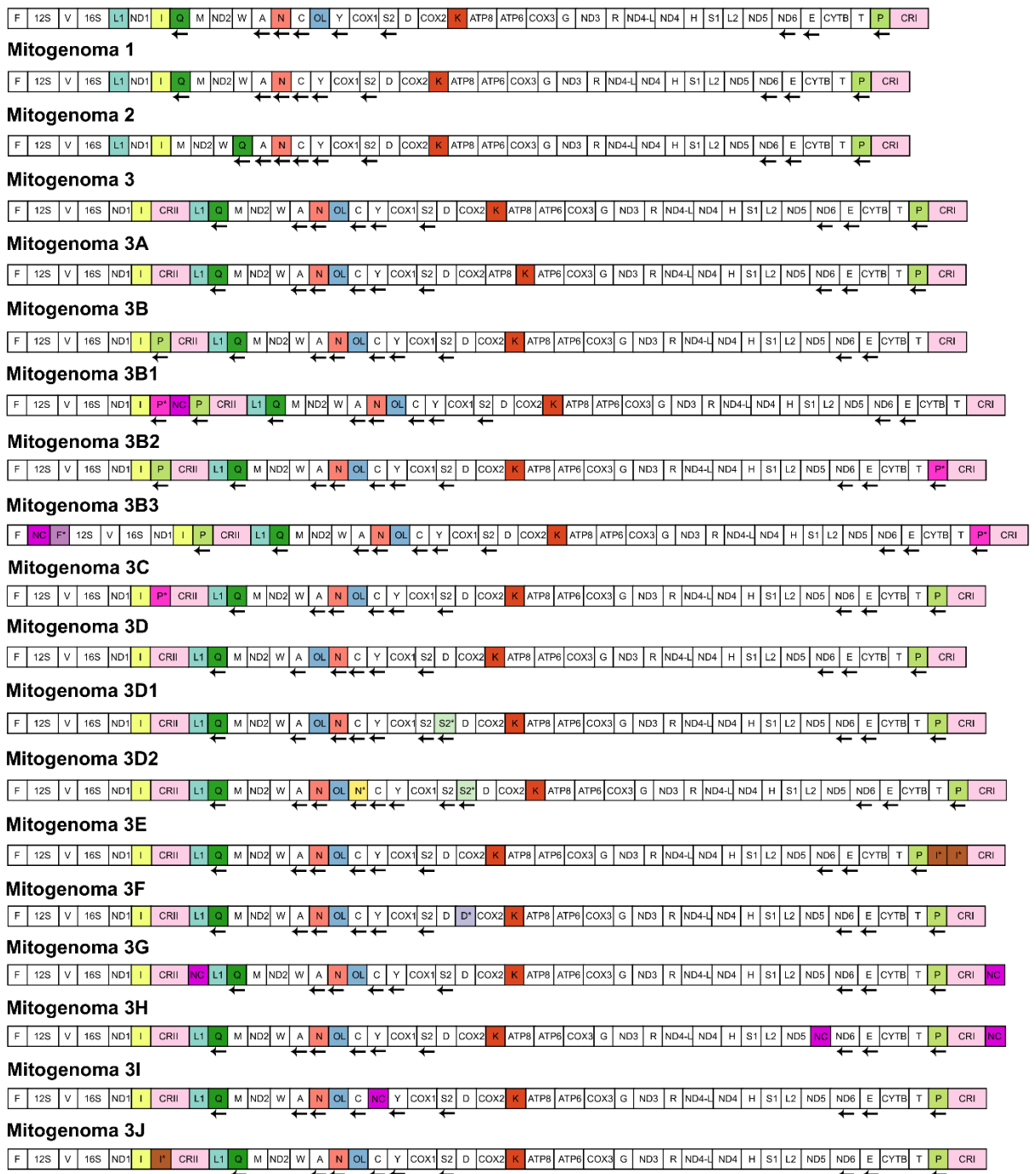
Inicialmente, os mitogenomas foram analisados para a identificação de possíveis *gaps* ou regiões não anotadas, pois essas características poderiam influenciar e mascarar a análise comparativa estrutural dos mitogenomas de Serpentes. Ao todo, cerca de 76 regiões não anotadas foram observadas nos 129 mitogenomas de serpentes analisados, 27 dessas regiões já haviam sido descritas, enquanto 51 não apresentavam nenhum registro. Das regiões não descritas, 18 foram recuperadas como possíveis tRNA, segmentos de genes e/ou segmentos de regiões controle do mesmo e/ou de diferentes mitogenomas (Apêndice 10). As regiões recuperadas com similaridade ao tRNA foram consideradas nas análises de comparação estrutural do mitogenomas.

Ao todo foram recuperadas 18 estruturas (mitótipos) de mitogenomas de Serpentes (Fig. 7). Dessas estruturas, 11 foram previamente descritas em revisões recentes ou em descrições específicas do mitogenoma (ALMEIDA et al., 2016; QIAN et al., 2018; MYERS; MULCAHY, 2020) – Mitogenomas 1, 2, 3, 3A, 3B, 3B2, 3B3, 3C, 3H, 3I e 3J – e sete foram reanotadas e/ou consideradas novos mitótipos devido à presença de tRNA e regiões não codificantes não reportadas previamente – Mitogenomas 3B1, 3D, 3D1, 3D2, 3E, 3F e 3G. Os mitogenomas foram nomeadas seguindo a descrição feita na última revisão por Qian et al. (2018) e pelas

relações filogenéticas recuperadas no presente estudo. As informações de características diagnósticas para os mitogenomas estão descritas na Tabela 5 e podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Diagramação das estruturas de mitogenomas (mitótipos) recuperados para Serpentes. Os mitogenomas foram nomeados de 1 a 3, 3A – 3J. Apesar de circular, cada mitótipo foi ilustrado de forma linear para melhor visualização. Fitas pesada (H) e leve (L) são indicadas pela ausência e presença de setas, respectivamente. Genes envolvidos em processos de rearranjos estão destacados em diferentes cores. Nomes de genes, tRNAs e rRNAs são apresentados de forma abreviada.

Estrutura típica do mitogenoma de vertebrados



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

Tabela 5 - Características diagnósticas de cada estrutura de mitogenoma observada em Serpentes.

Mitogenoma	Características	Descrição
1	1	Ausência da origem de replicação da fita leve (OL)
2	2	Ausência da origem de replicação da fita leve (OL) e translocação do tRNA-Gln (Q)
3	3	Duplicação seguida de translocação da região controle (CRII) e translocação do tRNA-Leu 1 (L1)
3A	4	Translocação do tRNA-Lys (K)
3B	5	Translocação do tRNA-Pro (P)
3B1	6	Duplicação seguida de translocação do tRNA-Pro (P*)
3B2	7	Duplicação do tRNA-Pro (P*) and presença de uma região não codificante (NC)
3B3	8	Duplicação do tRNA-Phe (F*), duplicação seguida de translocação do tRNA-Pro (P*) e presença de uma região não codificante (NC)
3C	9	Duplicação seguida por translocação do tRNA-Pro (P*)
3D	10	Translocação do tRNA-Asn (N)
3D1	11	Translocação do tRNA-Asn (N) and duplicação do tRNA-Ser2 (S2*)
3D2	12	Duplicação seguido de translocação do tRNA-Asn (N*) e duplicação do tRNA-Ser2 (S2*)
3E	13	Duplicação seguido de translocação do tRNA-Ile (I*) – 2x
3F	14	Duplicação do tRNA-Asp (D*)
3G	15	Presença de uma região não codificante (NC) após ambas as regiões controles (CRI e CRII)
3H	16	Presença de uma região não codificante (NC) anteriormente ao gene ND6 e após a região controle I (CRI)
3I	17	Presença de uma região não codificante (NC) anteriormente ao tRNA-Tyr (Y)
3J	18	Duplicação do tRNA-Ile (I*)

Nota: Os mitogenomas são os mesmos descritos nas Figuras 7 e 8. (CRI) = Região controle I; (CRII) = Região controle II; (D*) = duplicata do tRNA-Ácido Aspártico (Asp); (F*) = duplicata do tRNA-Fenilalanina (Phe); (I*) = duplicata do tRNA-Isoleucina (Ile); (L1) = tRNA-Leucina 1 (Leu1); (N) = tRNA-Asparagina (Ans); (N*) = duplicata do tRNA-Asn; (NC) = Região não codificante; (Ol) = Origem de replicação da fita leve; (P) = tRNA-Prolina (Pro); (P*) = duplicata do tRNA-Pro; (Q) = tRNA-Glicina (Gln); (S2*) = duplicata do tRNA-Serina 2 (Ser2); (Y) = tRNA-Tirosina (Tyr).

Ambos os métodos filogenéticos (BI e ML) recuperaram a mesma topologia, com exceção dos clados representados por Sibynophiidae, Colubridae, Dipsadidae e Natricidae, que foram recuperados como uma politomia na topologia obtida a partir do método de inferência Bayesiana (Apêndice 11).

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos por meio do método de Máxima-Verossimilhança (Fig. 8), cuja topologia recuperou Scolecophidia como grupo parafilético com alto suporte (ML: 100%), enquanto Aletinophidia foi recuperado como monofilético com alto suporte (ML: 100%).

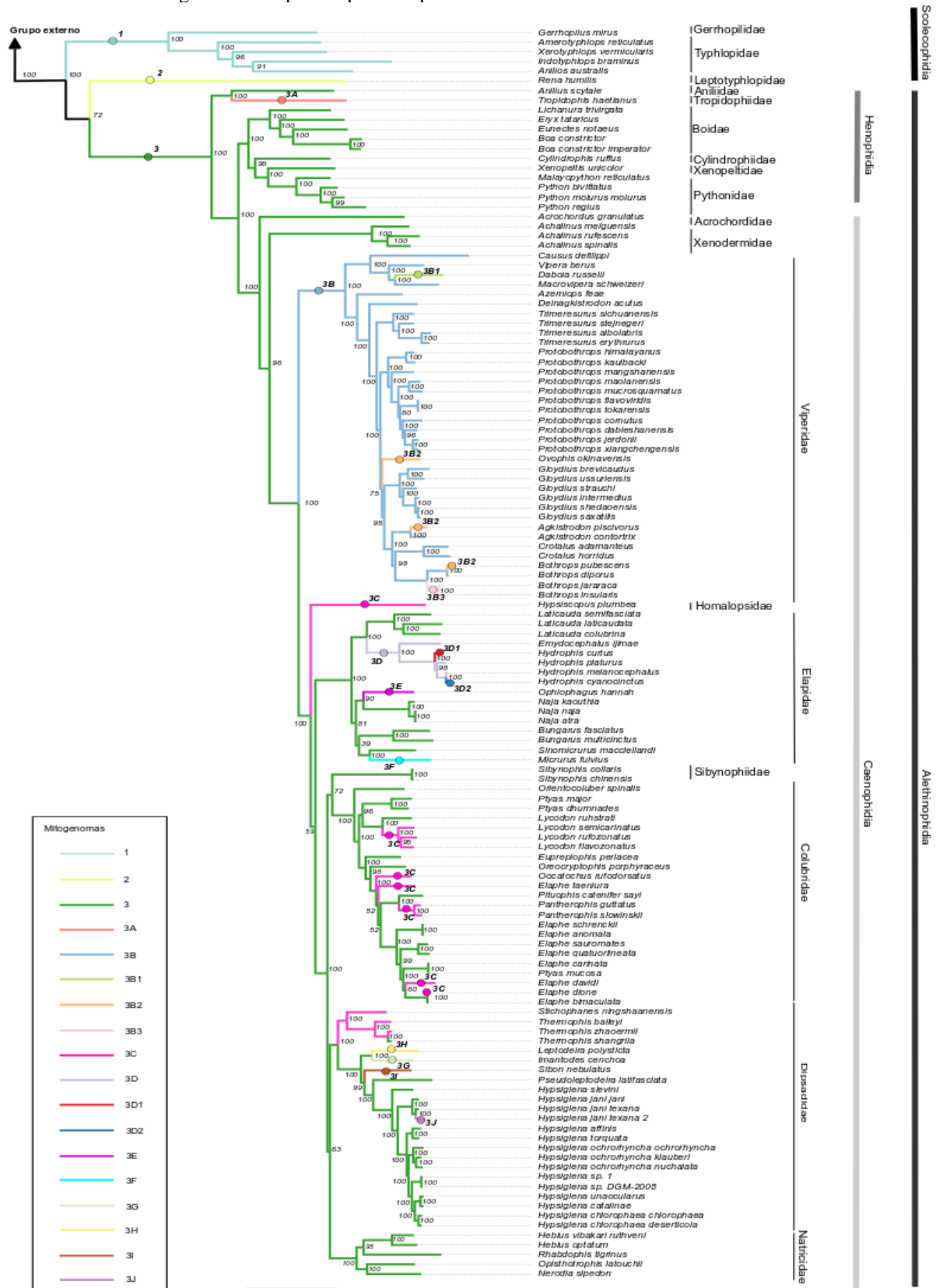
O clado de alto suporte (ML: 100%) formado por (Gerrhopilidae + Typhlopidae), ambas famílias de Scolecophidia, foi recuperado irmão dos demais táxons analisados com alto suporte (ML: 100%). Leptotyphlopidae, família de Scolecophidia, foi recuperada como grupo irmão do clado composto por Alethinophidia (ML: 72%). Dois clados principais foram recuperados

dentro de Alethinophidia: Henophidia, grupo parafilético, e Caenophidia, grupo monofilético de alto suporte (ML: 100%). O clado de alto suporte (ML: 100%) formado por (Aniliidae + Tropicodophiidae), famílias de Henophidia, foi recuperado como irmão de dois cladogramas: um formado pelos demais representantes de Henophidia (ML: 100%) e outro clado formado por todas as famílias de Caenophidia (ML: 100%). Dentro de Henophidia, Boidae foi recuperado como um clado de alto suporte (ML: 100%) e grupo irmão do clado formado por ((Cylindrophiiidae (Xenopeltidae + Pythonidae)) de alto suporte (ML: 98%).

No clado composto por Caenophidia, Acrochordidae foi o primeiro clado a divergir (alto suporte; ML: 100%), seguido por Xenodermidae, Viperidae e Homalopsidae com alto suporte (ML > 96%). A seguir, Elapidae foi recuperado como grupo irmão das demais famílias (baixo suporte; ML: 59%), as quais foram recuperadas em dois cladogramas distintos e com alto valor de suporte (ML: 100%): o primeiro, composto por (Sibynophiidae + Colubridae), apresentou baixo valor de suporte (ML: 72%), e o outro clado, composto por (Dipsadidae + Natricidae), também apresentou baixo valor de suporte (ML: 63%). Apesar dos baixos suportes recuperados, o suporte recuperado para cada uma das quatro famílias isoladas (Sibynophiidae, Colubridae, Dipsadidae e Natricidae) foi alto (ML: 100%).

O mitogenoma 1 é caracterizado pela ausência da região OL e é restrito às famílias Gerrophilidae e Typhlopidae. O mitogenoma 2 é caracterizado pela ausência da região OL, presença do tRNA-Glutamina (tRNA-Gln ou Q) anteriormente ao tRNA-Asparagina (tRNA-Asn ou A) e é restrito à família Leptotyphlopidae. O mitogenoma 3 é caracterizado pela presença do tRNA-Leucina 1 (tRNA-Leu 1 ou L1) anteriormente ao tRNA-Q, pela duplicação seguida de translocação da região controle (CRII) anteriormente ao tRNA-L1 e é amplamente distribuído em Alethinophidia.

Figura 8 - Árvore filogenética obtida por meio do método de máxima verossimilhança, a partir de uma matriz de 13 genes de proteínas codificantes e duas subunidades do rRNA mitocondrial. Os números próximos aos nós são os valores de suporte obtidos. Os números em negrito, próximos aos círculos, correspondem aos mitogenomas 1 a 3J. Os mitogenomas 1 a 3J representam os mesmos mitogenomas descritos na Figura 7. A cor de cada ramo e círculo indica o mitogenoma recuperado para a espécie ou família.



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

O mitogenoma 3A é caracterizado pela presença do tRNA-Lisina (tRNA-Lys ou K) anteriormente ao gene ATP6 e é restrito à família Aniliidae. O mitogenoma 3B é caracterizado pela presença do tRNA-P anteriormente a CRII e é restrito à família Viperidae. Os mitogenomas 3B1, 3B2 e 3B3 são variações do mitogenoma 3B, observados em espécies específicas: o 3B1 é caracterizado pela presença de uma duplicata do tRNA-P (P*), de uma região não codificante anteriormente ao tRNA-P e é restrito a *Daboia ruselli*; o 3B2 é caracterizado pela presença de uma duplicata do tRNA-P (P*) anteriormente à CRI e é restrito às espécies *Ovophis okinavensis*, *Agkistrodon piscivorus* e *B. pubescens*; o 3B3 é caracterizado pela presença de uma duplicata de tRNA-Phe (F*), uma região não codificante anteriormente à subunidade 12S do mt rRNA e é restrita às espécies *B. insularis* e *B. jararaca*.

O mitogenoma 3C é caracterizado pela presença de uma duplicata de tRNA-P (P*) anteriormente a CRII e é distribuída em espécies das famílias Homalopsidae, Colubridae e Dipsadidae. O mitogenoma 3D é caracterizado pela presença do tRNA-Asparagina (Asn ou N) anteriormente ao tRNA-Cisteína (Cys ou C) e é restrito às espécies *Emydocephalus ijimae*, *Hydrophis platurus*, *H. melanocephalus* da família Elapidae. O mitogenoma 3D1 é caracterizado pela presença do tRNA-N anteriormente ao tRNA-C, pela duplicata do tRNA-Serina 2 (Ser2 ou S2*) anteriormente ao tRNA-Ácido aspártico (Asp ou D) e é restrito a *H. curtus* (Elapidae). O mitogenoma 3D2 é caracterizado pela translocação do tRNA-N à região anterior ao OL, pela presença da duplicata de tRNA-N (N*) anteriormente ao tRNA-C, pela presença da duplicata de tRNA-S2 (S2*) anteriormente ao tRNA-D e é restrito a espécie *H. cyanocinctus* (Elapidae). O mitogenoma 3E é caracterizado pela presença de duas duplicatas do tRNA-Ile (I*) anteriormente a CRI e é restrito a espécies *Ophiophagus hannah* (Elapidae). O mitogenoma 3F é caracterizado pela presença de uma duplicata do tRNA-D (D*) anteriormente ao gene COX2 e é restrito a espécie *Micrurus fulvius* (Elapidae).

O mitogenoma 3G é caracterizado pela presença de duas regiões não codificantes posteriores à ambas as regiões controles (CRI e CRII) e é restrito a espécie *Imantodes cenchoa* (Dipsadidae); o 3H é caracterizado pela presença de duas regiões não codificantes, uma anteriormente ao gene ND6 e outra posteriormente a CRI e é restrito a espécie *Leptodeira polysticta* (Dipsadidae); o 3I é caracterizado pela presença de uma região não codificante anteriormente ao tRNA-Tirosina (Tyr ou Y) e é restrito a espécie *Sibon nebulatus* (Dipsadidae). O mitogenoma 3J é caracterizado pela presença de uma duplicata de tRNA-Ile (I*)

anteriormente a CRII e é restrito a um haplótipo da espécie *Hypsiglena jani texana* 2 (Dipsadidae).

4.3. Prospecção de marcadores microssatélites específicos de *B. insularis*

A partir da versão total do genoma de *B. insularis*, foram preditas possíveis regiões de microssatélites, conforme descrito no item 3.4 da metodologia. Ao todo, foram recuperados 6.078 microssatélites perfeitos, dos quais 3.787 apresentavam tamanho maiores que 150 pb. Dos 3.787 microssatélites, somente 2.487 foram indicados para o desenho dos *primers* nas condições estipuladas, dos quais 110 são microssatélites de cópia única de motivos de repetição Di-, Tetra- e Penta-, enquanto 89 são microssatélites de cópia única de motivos de repetição Tri- e Hexa-. Dos 110 microssatélites com motivo de repetição di-, tetra e penta-; 74 obtiveram sequências de *primers* desenhadas. Dos 89 microssatélites com motivo de repetição tri- e hexa-; 45 obtiveram sequências de *primers* desenhadas. Os *primers* desenhados serão testados durante as próximas etapas desse estudo, a serem desenvolvidas durante o doutorado do aluno.

4.4. Genética de população de *B. insularis*

Após a análise da qualidade dos dados e os testes de desequilíbrio de ligação e presença de alelos nulos, um total de 21 locos e quatro indivíduos foram excluídos: (i) 11 locos excluídos devido à ausência de amplificação, (ii) três locos e quatro indivíduos excluídos devido a quantidade excessiva (> 30%) de erros de genotipagem e *missing data*; (iii) evidência de desequilíbrio de ligação e de alelos nulos foram encontrados em dois e cinco locos, respectivamente, sendo, posteriormente, excluídos.

Dessa forma, as análises populacionais foram conduzidas com base na matriz genética contendo 79 indivíduos (49 *ex situ* e 30 *in situ*) e 12 locos (Bmar_076, Bpau_002, Bpau_014, Bpau_059, Bpau_083, Bpau_130, Bmat_010, Bmat_049, Bmat_060, Bmat_070, Bmat_080 e Bmat_106) (Apêndice 12).

Após a correção de Bonferroni, nove locos (quatro na população *in situ*; cinco na população *ex situ*) indicaram um desvio significativo de HWE ($p \leq 0,004$). No entanto, somente um loco (Bmat_106) indicou desvio de HWE nas duas populações e, por isso, foi excluído das análises a fim de evitar erros. As análises posteriores foram, portanto, realizadas empregando 11 microssatélites heterólogos.

4.4.1. Diversidade genética

Os 11 microssatélites apresentaram valores similares de diversidade genética entre as populações (Tabela 6). O número de alelos (A) variou de 2 a 6, considerando ambas as populações, com um total de 37 e 36 alelos nas populações *ex situ* e *in situ*, respectivamente. A riqueza alélica (AR) variou de 1,95 – 5 considerando ambas as populações. Além disso, as populações *ex situ* e *in situ* contêm 10 e nove alelos, respectivamente. Os índices de heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) são, em média, similares nas populações ($H_{o\ ex\ situ} = 0,59$; $H_{o\ in\ situ} = 0,53$; $H_{e\ ex\ situ} = 0,48$; $H_{e\ in\ situ} = 0,47$), com a menor heterozigose recuperada no loco Bmat_080.

4.4.2. Endocruzamento

Foram recuperados valores negativos e significativos para o F_{is} médio de ambas as populações ($F_{is\ ex\ situ} = -0,24/CI = -0,43 < x < -0,06$; $F_{is\ in\ situ} = -0,12/CI = -0,43 < x < 0,09$; Tabela 6). As duas populações apresentaram valores positivos de f_{is} , porém, significativo somente para a população *in situ* ($f_{is\ ex\ situ} = 0,05/CI = -0,42 < x < -0,02$; $f_{is\ in\ situ} = 0,06/CI = -0,40 < x < 0,10$).

4.4.3. Efeito gargalo

Sob os modelos testados, os resultados obtidos não evidenciam a ocorrência de efeito gargalo recente na população *in situ* (IAM: 0,03; SMM: 0,55). No entanto, é preciso ressaltar que sob o modelo IAM, nove de 11 locos apresentam excesso de heterozigosidade, indicando que novos marcadores devem ser usados para confirmar a ausência ou a ocorrência de efeito gargalo recente na população.

4.4.4. Índices de diferenciação populacional

Os valores obtidos de diferenciação populacional são apresentados na Tabela 7. Todos os índices de diferenciação recuperados indicam, em média, um grau de diferenciação pequeno e significativo ($F_{st} = 0,07/CI = 0,01 < x < 0,13$; $G_{st} = 0,12/CI = 0,05 < x < 0,20$; $D_{est} = 0,06/CI = 0,02 < x < 0,10$), corroborando os resultados obtidos no AMOVA (variações entre populações = 12%, $p < 0,001$). No entanto, alguns locos apresentaram valores moderados a altos de diferenciação (p.ex. Bmat_070); o que pode estar relacionado com a existência de alelos privados (Tabela 6) ou a diferença das frequências alélicas dentro da população (Apêndice 12).

Tabela 6 - Índices de diversidade obtidos a partir de marcadores microssatélites para as populações de *Bothrops insularis*.

Locos	Motivo de repetição	Populações											
		<i>Ex situ</i>						<i>In situ</i>					
		A	AR	PA	Ho	He	F _{is}	A	AR	PA	Ho	He	F _{is}
Bmar_076	(GAG) _n	2	2,00		0,63	0,44	-0,45	2	2,00		0,60	0,51	-0,19
Bpau_002	(TCTAC) _n	4	3,40	2	0,82	0,54	-0,54	3	2,98	1	0,78	0,55	-0,44
Bpau_014	(CCAT) _n	2	2,00		0,56	0,45	-0,26	4	3,92	2	0,40	0,45	0,12
Bpau_059	(ATCC) _n	6	5,00	2	0,75	0,70	-0,07	4	4,00		0,74	0,71	0,05
Bpau_083	(TCA) _n	4	3,55	1	0,61	0,46	-0,32	3	2,96		0,42	0,39	-0,06
Bpau_130	(GAG) _n	2	2,00		0,47	0,47	0,02	2	2,00		0,40	0,33	-0,23
Bmat_010	(ATGG) _n	5	4,48	1	0,95	0,64	-0,49	4	3,96		0,55	0,52	-0,06
Bmat_049	(TGGA) _n	3	2,51	1	0,62	0,44	-0,42	2	2,00		0,23	0,35	0,33
Bmat_060	(CCAT) _n	5	4,81	2	0,68	0,73	0,07	5	5,00	2	0,67	0,71	0,08
Bmat_070	(TCCA) _n	2	2,00		0,32	0,30	-0,06	4	3,76	2	1	0,57	-0,78
Bmat_080	(GAG) _n	2	1,95	1	0,09	0,09	-0,04	3	2,76	2	0,03	0,13	0,74
Média		3,36	3,06		0,59	0,48	-0,24	3,27	3,21		0,53	0,47	-0,12

Nota: A = Número de alelos; AR = Riqueza alélica; PA = Número de alelos privados; Ho = Heterozigose observada; He = Heterozigose esperada; F_{is} = Coeficiente de endocruzamento do sistema de acasalamento.

Tabela 7 - Índices de diferenciação genética das populações *ex situ* e *in situ* de *Bothrops insularis*.

Locos	F _{st}	G _{st} '	D _{est}
Bmar_076	0,098	0,179	0,092
Bpau_002	-0,007	0,000	0,000
Bpau_014	-0,005	0,000	0,000
Bpau_059	-0,010	0,000	0,000
Bpau_083	0,035	0,047	0,023
Bpau_130	0,035	0,042	0,017
Bmat_010	0,089	0,191	0,124
Bmat_049	-0,026	0,000	0,000
Bmat_060	0,077	0,293	0,230
Bmat_070	0,316	0,543	0,297
Bmat_080	0,015	0,026	0,004
Média	0,07 (0,01 < x < 0,13)	0,12 (0,05 < x < 0,20)	0,06 (0,02 < x < 0,10)

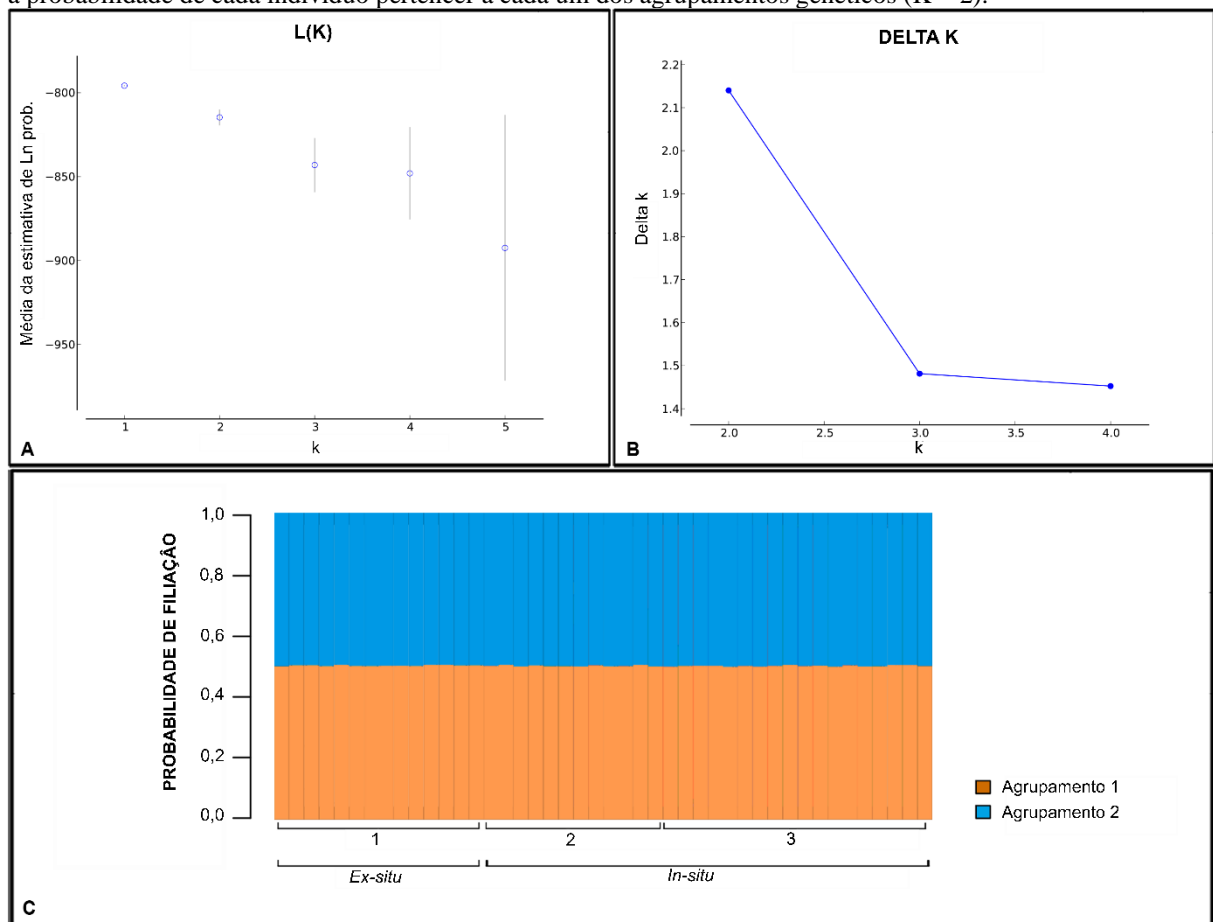
Nota: F_{st} = Índice de diferenciação de Wright; G_{st}' = análogo do F_{st} de Hendrick; D_{est} = Índice de diferenciação de Jost. Valores entre parênteses indicam o intervalo de confiança obtido por meio de 1.000 replicações com o método de *bootstrap*.

4.4.5. Estruturação genética populacional

A análise realizada no STRUCTURE sugere a existência de um ou dois agrupamentos genéticos dependendo do método usado. O método de probabilidade de *likelihood* recuperou um único agrupamento (K = 1; Fig. 9A), já o método de Evanno recuperou dois agrupamentos ($\Delta K = 2$; Fig. 9B). Janes e colaboradores (2017) destacam que o método de Evanno possui uma inconsistência relativa à tendência de escolher o número de agrupamentos mais prováveis (K)

como dois, ainda que não seja verdade. Esses autores e o manual do *software* sugerem que outros parâmetros, como o valor de *alfa* (α) e a distribuição da probabilidade de pertencimento dos indivíduos aos agrupamentos nos gráficos gerados pelo STRUCTURE sejam revisados e considerados para a determinação do número real de agrupamentos genéticos existentes. Para todos os números de K testados, foi recuperado $\alpha > 1$ e alta simetria na distribuição da probabilidade de pertencimento dos indivíduos aos agrupamentos, o que indica a ausência de subpopulações (Fig. 9C).

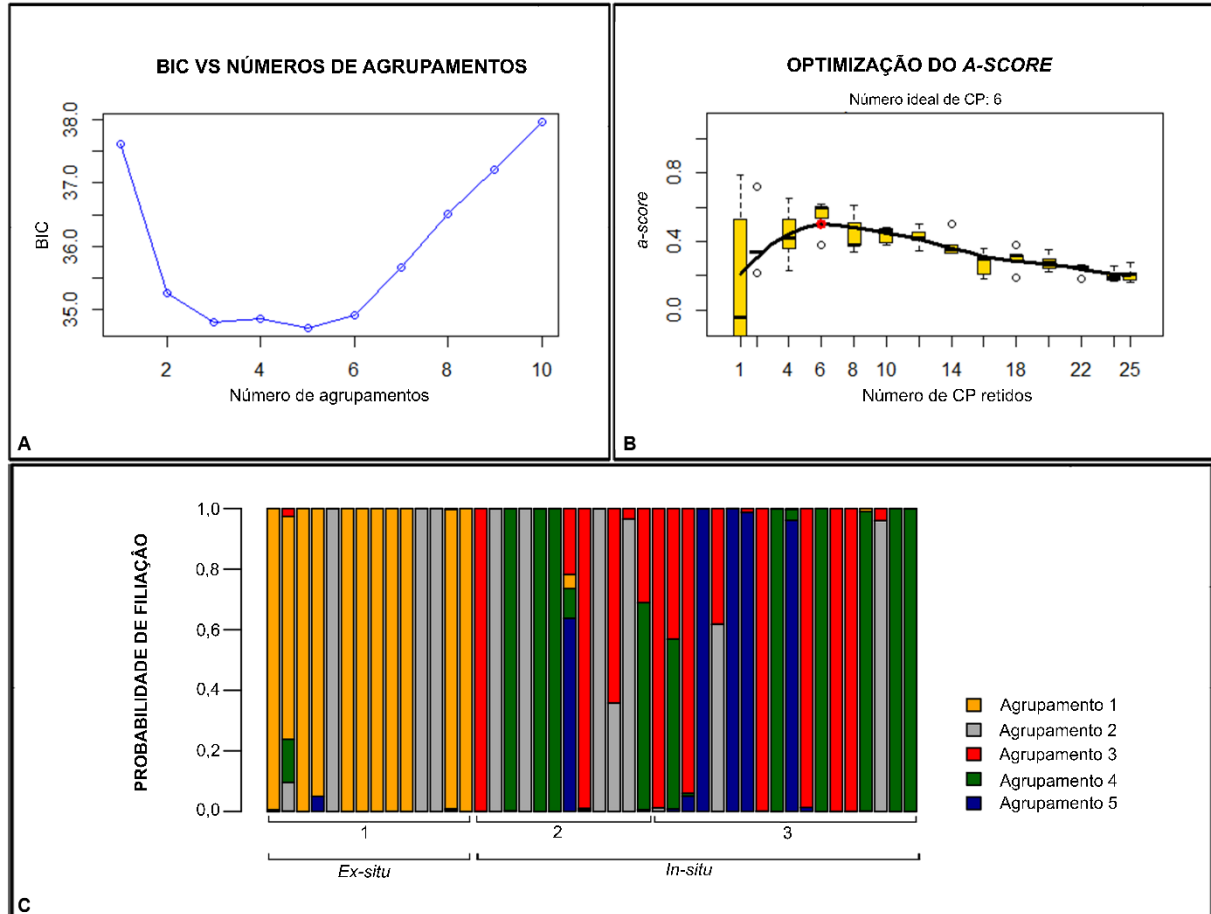
Figura 9 - Estruturação genética de *Bothrops insularis* obtida utilizando 11 microssatélites e o programa STRUCTURE. (A) Gráfico da probabilidade de *likelihood* como uma função de K (método de Prob (LnK); melhor K = 1). (B) Gráfico de ΔK para *B. insularis* (método de Evanno; melhor K = 2). (C) Gráfico de barras apresentando a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos agrupamentos genéticos (K = 2).



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

Análise de DAPC indicou a existência de cinco agrupamentos com base nos valores de BIC (K = 5, Fig. 10A), sugerindo uma possível estruturação genética não recuperada no STRUCTURE. Além disso, a análise de DAPC recuperou quatro agrupamentos exclusivos a uma única população, representados por: laranja para a população *ex situ*; e vermelho, verde e azul para a população *in situ* (Fig. 10C). Nenhuma relação espacial entre os agrupamentos da ilha foi observada (Fig. 10C).

Figura 10 - Estrutura genética de *Bothrops insularis* usando 11 microssatélites e a análise discriminantes de componentes principais. (A) Gráfico do Critério Bayesiano de Informação (do inglês *Bayesian Information Criterion* – BIC) em função de K (melhor K = 5). (B) Gráfico da pontuação de alfa (α -scored) em função do número de componentes principais (PC; melhor número de PCs = 6). (C) Gráfico de barras apresentando a probabilidade de cada indivíduo pertencer a um determinado agrupamento (K = 5). Note a existência de um agrupamento exclusivo à população *ex situ* (laranja) e a ausência de correlação entre as áreas de amostragem (2 e 3) com os agrupamentos recuperados (vermelho, cinza, azul e verde) na população *in situ*.



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

4.5.6. Manejo genético e reprodutiva da população *ex situ* de *B. insularis*

Foi recuperado um valor médio de parentesco para a população *ex situ* de 0,20, com base nos 34 indivíduos vivos (Apêndice 13), o que sugere que a população é formada por indivíduos com médio grau de parentesco. Os indivíduos ID06FF, ID013F e ID021F foram excluídos do Apêndice 13 e das análises de seleção de pares preferências em decorrência de suas mortes e, conseqüentemente, incapacidade de contribuir como parentais nas próximas gerações.

Os dados genéticos de parentesco permitiram a resolução de dois casos de incertezas parentais (três incertezas paternas e cinco incertezas maternas). Devido a morte de um possível pai (ID0001) e a ausência de tecido para o acesso da informação genética, não foi possível testar a paternidade. Portanto, o teste de paternidade foi conduzido somente com o possível pai

(ID011F), o qual revelou valores de coeficiente de parentesco (R) entre este indivíduo e os seus possíveis descendentes (ID06FF, ID08FF e ID09FF; Tabela 8; Apêndice 14), excluindo a suspeita de paternidade. As análises de maternidade recuperaram uma única possível mãe para cada descendente (Tabela 8; Apêndice 14): mãe ID0009 e descendente ID011F, mãe ID0010 e descendente ID013F, mãe ID0010 e descendente ID014F, mãe ID0006 e descendente ID015F, e mãe ID0013 e descendente ID021F.

Após a resolução das incertezas parentais, um heredograma da população *ex situ* foi desenhado, integrando os dados obtidos nesse estudo e informações de cruzamentos prévios (Apêndice 14). Além disso, a fim de que cada fundador possa contribuir geneticamente com a descendência da população *ex situ*, evitando a ocorrência de endocruzamentos, seis pares preferenciais para cruzamento – do ponto de vista genético – foram sugeridos (Tabela 9).

Tabela 8 - Análise de parentesco entre os descendentes de possíveis parentais. Valor de p obtido por meio do programa *ML-Relate*.

Possível parental		Descendentes							
ID	Sexo	ID06FF	ID08FF	ID09FF	ID011F	ID013F	ID014F	ID015F	ID021F
ID011F	Macho	1,000	0,170	0,687	-	-	-	-	-
ID0003	Fêmea	-	-	-	0,169	0,108	0,123	0,065	0,073
ID0005	Fêmea	-	-	-	0,186	0,318	0,629	0,192	0,188
ID0006	Fêmea	-	-	-	1,000	0,043	0,110	0,054 ^a	0,125
ID0007	Fêmea	-	-	-	0,190	1,000	0,138	1,000	1,000
ID0008	Fêmea	-	-	-	0,195	1,000	1,000	1,000	0,200
ID0009	Fêmea	-	-	-	0,146 ^a	0,966	0,177	0,639	0,179
ID0010	Fêmea	-	-	-	0,728	0,026 ^a	0,024 ^a	0,147	0,173
ID0011	Fêmea	-	-	-	0,653	1,000	0,968	0,810	0,814
ID0012	Fêmea	-	-	-	0,900	1,000	1,000	0,104	0,049
ID0013	Fêmea	-	-	-	0,881	1,000	1,000	0,097	0,046 ^a

Nota: ^a = Indivíduos com maior probabilidade de maternidade para com o respectivo descendente.

Tabela 9 - Lista de pares sugeridos para acasalamento preferencial, de acordo com os dados obtidos por microssatélites.

Macho	Média de parentesco	Fêmea	Média de parentesco	R
ID0018	0,25	ID0007	0,17	0,06
ID0017	0,15	ID014F	0,11	0
ID009F	0,12	ID001F	0,18	0
ID27FF	0,18	ID09FF	0,14	0,06
ID11FF	0,12	ID03FF	0,19	0
ID19FF	0,17	ID08FF	0,13	0

Nota: R = Coeficiente de parentesco entre cada par de indivíduos.

5. DISCUSSÃO

Estudos e programas de conservação têm sido implementados em espécies com algum grau de risco de extinção, principalmente espécies em perigo e criticamente em perigo (RODRIGUEZ et al., 2012; REYNOLDS et al., 2015; MCLENNAN et al., 2018). Nessa perspectiva, esse estudo é uma contribuição para o programa de conservação de *B. insularis*, uma serpente endêmica do Brasil e criticamente em perigo, para a qual está sendo descrito o primeiro painel da diversidade genética das populações *in situ* e *ex situ*, além do seu mitogenoma e a primeira versão (preliminar) do genoma. Os parâmetros genéticos apresentados no presente estudo são almeçados pelo Plano Nacional de Conservação da Herpetofauna Insular (BATAUS et al., 2011), os quais devem contribuir para a delimitação e manutenção de estratégias de conservação que contemplam a espécie, bem como na compreensão de sua história e padrões evolutivos.

Além da sua inclusão na lista de espécie ameaçada em âmbito estadual, nacional e internacional, *B. insularis* deve ser conservada e estudada devido: (i) a sua história evolutiva única, demonstrada pelo seu processo de diversificação e relação filogenética dentro do grupo *B. jararaca* (GRAZZIOTIN et al., 2006; ALENCAR et al., 2016, HAMDAN et al., 2020); (ii) sua especificidade ecológica e reprodutiva, por exemplo: sua dieta, composição específica do veneno especializado para aves e presença de hemiclitoris em fêmeas (HOGE et al., 1953; MARTINS et al., 2002; MARQUES et al., 2012; ZELANIS et al., 2008); (iii) e a possibilidade de usar essa espécie de serpente como um modelo para estudos evolutivos e ecológicos (DUARTE; PUORTO; FRANCO; 1995).

5.1. Genoma de *B. insularis* v.1.0

Este estudo apresenta a primeira descrição do genoma de *Bothrops insularis*, obtido de forma individual para cada um dos três exemplares e de forma total (analisando todas as leituras obtidas para uma única montagem). Os dados relativos a cada um dos genomas individuais, em especial as análises de BUSCO, indicam que esses genomas apresentaram baixa integridade, de modo que as análises e interpretações descritas nessa seção envolveram o genoma total.

O tamanho predito para o genoma de *B. insularis* foi de 2,3 Gpb, como esperado para o genoma de Serpentes, predito entre 1,6 e 2,6 Gpb (ATKIN et al., 1965; CASTOE et al., 2013). O tamanho obtido do genoma de *B. insularis* foi de 1,5 Gpb, o que corresponde a 67.8% do

genoma predito e possui uma profundidade de cobertura média de 20x. O tamanho obtido é similar e aproximado ao tamanho obtido dos genomas de outras Serpentes da família Viperidae, que variam entre 1,1 e 1,7 Gb (Tabela 15; VON et al., 2013; ALMEIDA; 2016; PAQUESI et al., 2018). Além disso, foi recuperada uma porcentagem de conteúdo GC (GC%) próximo àquelas obtidas em Serpentes (*B. insularis*: 39.75%; outras Serpentes: 34,3 – 41,8%; Tabela 10).

A profundidade de cobertura média foi menor do que aquela observada na maioria dos genomas de Serpentes já depositados, o que justifica as divergências obtidas em relação aos parâmetros N50 e L50 (Tabela 10). A análise de integridade do genoma obtida a partir do BUSCO indicou a presença de 65% de genes conservados de eucariotos, uma integridade menor do que a obtida para o genoma de *B. jararaca* (Viperidae, Brasil; 84.27% dos genes), porém maior do que a obtida para *Myanophis thanlynensis* (Homalopsidae, Mianmar; 41% dos genes). Segundo Castoe et al. (2013), valores mais baixos de N50 e L50 estão associados com a abordagem utilizada no sequenciamento; a ausência de uma abordagem de leituras longas dificulta na obtenção de *contigs* e *scaffolds* mais longos.

Dessa forma, aventamos a hipótese de que a integridade menor, os parâmetros distintos de N50 e L50 e a baixa profundidade de cobertura do genoma de *B. insularis* podem estar associados ao tipo de abordagem utilizada no sequenciamento: leituras pequenas e pareadas de cerca de 100 bp. Por isso, este trabalho irá seguir com a compreensão e montagem do genoma de *B. insularis* empregando, a priori, técnicas de sequenciamento de leituras longas, como foi realizado para a obtenção do genoma de *B. jararaca* e de *Python molurus* (CASTOE et al., 2013; ALMEIDA et al., 2021).

As análises das regiões repetitivas e de regiões de elementos transponíveis indicaram a presença de 9.01% dessas regiões no genoma de *B. insularis*. Tal porcentagem é similar à encontrada para a primeira versão do genoma de *B. jararaca* (10%; Almeida, 2009). Porém, essas porcentagens diferem das esperadas para Serpentes, que, de uma forma geral, apresentam uma alta taxa de regiões repetitivas e regiões de elementos transponíveis no genoma (entre 20% a 60%; CASTOE et al., 2013; PASQUESI et al., 2018). Almeida (2009) sugere que a menor taxa observada pode estar associada a parâmetros e processos específicos do montador utilizado para a montagem do genoma. É possível que a menor taxa observada no presente estudo esteja associada, principalmente, a baixa profundidade de cobertura obtida para o genoma de *B. insularis*.

Tabela 10 - Informações estatísticas dos genomas de Serpentes disponíveis do *Genbank*.

Espécie	Número de Acesso	Tamanho (Gb)	N50	L50	GC %	Profundidade do genoma	Referência
<i>Bothrops insularis</i>	-	1,56	7.359	55.543	39,75	20 X	Este estudo
<i>Bothrops jararaca</i>	GCA018340635	1,67	162.550	2.433	40,3	150 X	Almeida, 2016
<i>Chrysoplea ornata</i>	GCA019457694	1,33	1.484	267.395	40,7	25 X	-
<i>Crotalus adamantus</i>	GCA018446365	1,59	338.034	1.275	40	60 X	-
<i>Crotalus horridus</i>	GCA001625485	1,52	5.835	62.948	34,3	135 X	-
<i>Crotalus pyrrhus</i>	GCA000737285	1,12	4.103	76.110	38,5	40 X	-
<i>Crotalus tigris</i>	GCA016545835	1,61	2.106.662	194	39,9	168 X	Margres et al., 2021
<i>Crotalus viridis</i>	GCA003400415	1,34	14.888	22.243	39,36	1000 X	Pasquesi et al., 2018
<i>Emydocephalus ijimae</i>	GCA004319985	1,62	18.545	24.838	40,3	82 X	Kishida et al., 2019
<i>Hydrophis curtus</i>	GCA019472885	1,96	9.704	50	40,51	290 X	Li et al., 2021
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	GCA019473425	1,98	18.985.681	27	40,55	318 X	Li et al., 2021
<i>Hydrophis hardwickii</i>	GCA004023765	1,29	2.852	115.477	37,2	86 X	-
<i>Hydrophis melanocephalus</i>	GCA004320005	1,40	7.411	46.598	34,8	155 X	Kishida et al., 2019
<i>Laticauda colubrina</i>	GCA015471245	2,03	38.278	13.883	37,6	43 X	Kishida et al., 2019
<i>Laticauda laticauda</i>	GCA004320025	1,55	35.581	12.655	40,1	133 X	Kishida et al., 2019
<i>Myanophis thanlynensis</i>	GCA017656035	1,31	7.005	54.484	39,2	81 X	Kohler et al., 2021
<i>Naja naja</i>	GCA009733165	1,76	302.474	1.397	40,39	60 X	Sutyamohas et al., 2020
<i>Notechis scutatus</i>	GCA900518725	1,66	31.763	13.462	40,2	71 X	-
<i>Ophiophagus hannah</i>	GCA000516915	1,59	5.201	71.224	-	28 X	Vonk et al., 2013
<i>Pantherophis guttatus</i>	GCA001185365	1,70	37.981	11.281	40,8	75 X	Ullate-Agate et al., 2014; 2020
<i>Pantherophis obsoletus</i>	GCA012654085	1,69	38.205	11.121	39,1	92 X	-
<i>Pituophis catenifer pumilus</i>	GCA019677565	1,51	7.987	39.429	35,5	54 X	-
<i>Protobothrops flaoviridis</i>	GCA003402635	1,41	18.879	20.311	38,2	96 X	Shibata et al., 2018
<i>Protobothrops mucrosquamata</i>	GCA001527695	1,67	21.948	19.485	40,6	85.9 X	Aird et al., 2017
<i>Pseudonaja textilis</i>	GCA900518735	1,59	50.443	8.240	40,1	73 X	Earl et al., 2006

Continuação Tabela 10 – Informações estatísticas dos genomas de Serpentes disponíveis no *GenBank*.

Espécie	Número de Acesso	Tamanho (Gpb)	N50	L50	GC %	Profundidade do genoma	Referência
<i>Ptyas mucosa</i>	GCA012654045	1,72	41.154	10.404	39,2	59 X	-
<i>Python molurus bivittatus</i>	GCA000186305	1,43	10.658	38.693	39,7	20 X	Castoe et al., 2011; 2013
<i>Thamnophis elegans</i>	GCA009769535	1,67	4.620.601	83	41,15	62.12 X	Li et al., 2018
<i>Thamnophis sirtalis</i>	GCA001077635	1,42	10.447	28.683	41,8	72 X	Li et al., 2018
<i>Thermophis baileyi</i>	GCA003457575	1,74	18.227	25.622	-	185 X	Li et al., 2018
<i>Vipera berus</i>	GCA000800605	1,53	11.725	31.413	41,3	121 X	-

Apesar disso, vale ressaltar que os dados obtidos para os elementos repetitivos e elementos transponíveis convergem para a padrão evolutivo observado em Serpentes. Pasquesi et al. (2018), por exemplo, indicam a existência de uma maior quantidade de elementos repetitivos e transponíveis, o aumento dessas regiões e uma maior ocorrência de elementos LINEs, especialmente, em Serpentes da superfamília Colubroidea. Os dados obtidos no presente estudo, referentes a predição dos marcadores microssatélites específicos de *B. insularis*, também indicam uma maior quantidade de microssatélites de motivos de repetição tetra- e penta- (39,6% e 36,5%, respectivamente) e os dados referentes às regiões repetitivas também indicam que os elementos LINEs são os mais abundantes do genoma (5,27%); desses, o segmento L2/ CR1/ REX é o mais abundante (4,71%).

5.2. Caracterização e evolução do mitogenoma de Serpentes

A descrição do mitogenoma de *Bothrops insularis* é inédita. As metodologias distintas empregadas (*de novo* e a partir de uma molécula de referência) recuperaram moléculas altamente similares. Porém, a montagem *de novo* não recuperou a região controle I. Isso ocorre, provavelmente, devido à dificuldade de o algoritmo empregado distinguir as regiões controle, as quais possuem alta similaridade entre si dentro da mesma espécie - aproximadamente 98 % (DONG; KUMAZAWA, 2005; CASTOE et al., 2009a; 2009b). Por isso, o mitogenoma de *B. insularis* foi caracterizado a partir da montagem obtida por meio da comparação com o de *B. jararaca*.

A duplicação de tRNA e a presença de regiões não codificantes são características diagnósticas para distinguir os mitogenomas do gênero *Bothrops*, assim como para muitos grupos taxonômicos (ver JÜHLING et al., 2012). Ainda que os mitogenomas de vertebrados tendam a não possuir regiões não codificantes (BOORE, 1999; LANG et al., 1999; TAANMAN, 1999), a presença dessas e de outras regiões duplicadas podem ser explicadas como vestígios de rearranjos que modificaram genes, tRNA, regiões controle, bem como as posições, composições e ordem das sequências (MACEY et al., 1997; PEREIRA, 2000; BERNT et al., 2013b).

Assim, duas hipóteses acerca da origem das regiões duplicadas e das regiões não codificantes podem ser aventadas: (i) a ocorrência de um processo de duplicação envolvendo a região final da CRI e o tRNA-F, com a translocação das regiões duplicadas anteriormente a subunidade 12S do mt rRNA – tal hipótese poderia explicar a alta similaridade da região não

codificante para com as regiões controle (> 90%) e do tRNA-F* em relação ao tRNA-F (> 80%) em *B. insularis* e *B. jararaca*; e (ii) a ocorrência de uma duplicação envolvendo o tRNA-Pro (P) com translocação da região duplicada anteriormente a CRII em *B. pubescens*.

Alta similaridade de composição nucleotídica foi recuperada entre as espécies de *Bothrops*, as quais são similares às composições observadas em Serpentes da família Viperidae (p.ex. ver WU, 2019). Além disso, os mitogenomas das espécies de *Bothrops* apresentam uma predominância de conteúdo AT (AT%), conforme esperada para animais (BERNT et al., 2013b).

Recentemente, estudos que enfocam a compreensão e detecção de sinais de seleção no mitogenoma indicam que essa molécula evolui sob seleção purificadora devido ao seu papel na síntese de ATP e no processo de fosforilação oxidativa. No entanto, sinais de adaptação relacionados à presença de seleção positiva também foram reportados. Por exemplo, Sun et al. (2018) analisaram sinais de seleção nos genes mitocondriais do decápode *Shinkaicaris leurokolos* e identificaram sinais de seleção positiva nos genes ATP6, COX1, COX3, CYTB e NAD1-5, hipotetizando que tais sinais possam estar relacionados com a adaptação dessa espécie ao ambiente hidrotermal.

As análises de pares das espécies de *Bothrops* (*B. jararaca* e *B. insularis*, *B. diporus* e *B. pubescens*) permitiram a identificação de sinais de seleção positiva para dois genes: ATP6 e ND6: para o gene ATP6, a seleção positiva foi observada após a comparação das sequências de *Bothrops* do grupo *jararaca* com *B. pubescens*, porém, não é possível aventar uma hipótese de correlação do sinal observado com características adaptativas/especificidades ambientais das espécies; o sinal de seleção positiva observado para o gene ND6 na comparação entre *B. jararaca* e *B. insularis*, no entanto, poderia estar associada à adaptação insular, porém, estudos futuros e que foquem em testar tal associação são necessários para avaliar essa hipótese.

Além das análises relativas ao gênero *Bothrops*, este estudo realizou análises comparativas dos mitogenomas de 129 espécies (128 disponíveis no *GenBank* e o mitogenoma de *B. insularis*), as quais são distribuídas em 18 famílias. A inclusão de todas as sequências permitiu uma análise mais robusta e possibilidade de inferências relativas à evolução do mitogenoma de Serpentes, a partir da inclusão de 64 espécies e 4 famílias não analisadas na revisão anterior (QIAN et al., 2018). Vale ressaltar que o aumento no número de famílias se deve também ao uso da última revisão filogenômica da superfamília Colubroidea, a qual foi

dividida em 18 famílias (ZAHER et al., 2019), e a inclusão de uma espécie da família Gerrophiilidae.

As análises filogenéticas recuperaram parcialmente as relações observadas em estudos recentes para Squamata, envolvendo o uso de supermatrizes e filogenômica (p. ex. ZHENG; WEINS, 2016 – 52 genes e 4162 espécies; ZAHER et al., 2019 – 6 genes mitocondriais, 9 genes nucleares e 1278 espécies), porém algumas divergências valem ser destacadas. A primeira se relaciona ao parafiletismo de Scolecophidia, para a qual nossos resultados corroboram os observados por Miralles et al. (2018) e Qian et al. (2018), porém discordam do monofiletismo observado por Zheng e Weins (2016). Entretanto, ressalta-se que os clados parafiléticos recuperados neste estudo (Clado 1: Gerrophiilidae + Typhlopidae; Clado 2: Leptotyphlopidae) diferem daqueles observados pelo estudo anterior (Clado 1: Leptotyphlopidae + Gerrhopidae + Xenotyphlopidae + Typhlopidae; Clade 2: Anomalepididae; MIRALLES et al., 2018). Além disso, a família Natricidae, a qual foi recuperada como grupo irmão de Dipsadidae neste estudo, foi recuperada como grupo irmão do clado (Sybnophiidae + Colubridae) por Zaher et al. (2019). Provavelmente, essas divergências estão relacionadas aos diferentes números de genes e táxons utilizados nos estudos.

Além da abordagem filogenética, as análises comparativas focando na ordem gênica e estrutura dos mitogenomas permitiram a identificação de 18 tipos de mitogenomas em Serpentes (mitótipos), com novas conformações e uma maior diversidade do que prevista anteriormente (QIAN et al., 2018). Vale destacar que a identificação de uma maior diversidade de mitogenomas foi possível a partir da revisão envolvendo as regiões não anotadas nos mitogenomas disponíveis. A presença de tais regiões pode estar associada a erros de classificação e identificação de regiões devido à automatização da anotação, conforme foi observado em mamíferos por Prada e Boore (2019). Logo, as regiões propostas neste estudo devem pertencer e existir nos mitogenomas analisados, embora estudos com mais representantes das espécies sejam necessários para confirmar a existência das regiões propostas.

As divergências estruturais e de ordem gênica observadas nos mitogenomas estão associadas com rearranjos que envolvem regiões não codificantes (p. ex. a região O1) e/ou regiões de tRNA. Tais rearranjos têm sido observados em agrupamentos de tRNAs, os quais são considerados regiões propícias a rearranjos devido a alta probabilidade de sofrerem mutações (KUMAZAWA; NISHIDA, 1995; MACEY et al., 1997). Neste estudo, foram

observados rearranjos em agrupamentos previamente descritos (*WAN-OL-CY* e *CR + tRNA* adjacentes; QIAN et al., 2018) e em um novo agrupamento: tRNA “S2D”.

Alguns grupos de metazoários apresentam variações na ordem gênica do agrupamento *WAN-OLCY* (p. ex. ver MAURO et al., 2006; FUJITA et al., 2007; BERNT et al., 2013a). Tais variações incluem, por exemplo: (i) a presença de uma duplicata do tRNA-N (N*) em cecílias (MUELLER; BOORE, 2005); (ii) a presença de uma duplicata de tRNA-C (C*) em peixes (MUELLER; BOORE, 2005); (iii) a ausência da região OL em Typhlopidae (QIAN et al., 2018); e (iv) a ausência da região OL e a translocação do tRNA-Q em *Rena humilis* (Leptotyphlopidae; QIAN et al., 2018). No presente estudo, foram reportadas variáveis previamente descritas (QIAN et al., 2018) e novas variações que envolvem a presença de duplicatas de tRNA-N (N*) em *Hydrophis cyanocinctus* e a inversão da ordem da região OL e do tRNA-N em *H. curtus*, *H. melanocephalus* e *Emydocephalus ijimae*.

Alguns grupos de metazoários apresentam variações envolvendo as regiões controle e os agrupamentos de tRNA adjacentes as mesmas (p. ex. ver BERNT et al., 2013a). Em Serpentes, as variações observadas envolvendo esses agrupamentos se relacionam com a presença de duplicatas dos tRNA tRNA-P (P*), tRNA-I (I*), e tRNA-F(F*), bem como suas translocações (CHEN; ZHAO, 2009; ALMEIDA et al., 2016; QIAN et al., 2018; MYER; MULCAHY, 2020). No presente estudo, foram recuperados os seguintes rearranjos: (i) a presença da duplicação do tRNA-F (F*) e da região não codificante em *B. insularis*, conforme observado em *B. jararaca* por Almeida et al. (2016); (ii) a presença da duplicata do tRNA-P (P*) e da região não codificante em *Daboia ruselli*; (iii) a presença de duas duplicatas do tRNA-I (I*) e translocação das mesmas em *Ophiophagus hannah*; e (iv) a presença de uma duplicata do tRNA-I (I*) em *Hypsiglena jana texana 2*, reportada anteriormente por Myers e Mulcahy (2020).

Apesar de ter sido reportada na descrição do seu mitogenoma (CHEN; LAI, 2010), a variação em *O. hannah* não foi indicada na última revisão do mitogenoma de Serpentes, e por isso, esse mitogenoma está sendo considerado como reanotado no presente estudo.

Por fim, variações envolvendo o agrupamento S2D nunca foram descritos para Serpentes e, portanto, as variações observadas podem ser consideradas novidades dessa revisão. Neste estudo, são reportadas a presença de duplicatas de tRNA-Ser 2 (S2*) em *Hydrophis curtus* e *H. cyanocinctus*, e a presença da duplicata do tRNA-Asp (D*) em *Micrurus fulvius*.

A origem dos rearranjos destacados, apesar de ocorrerem em regiões diversas, pode ser explicada pela ocorrência de erros durante o processo de replicação associado a alta taxa de mutações do DNA mitocondrial de Serpentes quando comparada com a taxa de mutações dessa molécula de outros animais (KUMAZAWA; NISHIDA, 1995; MACEY et al., 1997; JIANG et al., 2007; CASTOE et al., 2009a; BERNT et al., 2013a). Esses erros podem levar à ocorrência de processos de rearranjos como a duplicação em tandem seguida de perda randômica (do inglês *tandem duplication and random loss* – TDRL), associada ou não a processos de translocação das regiões duplicadas ou do segmento original, o que promove variações gênicas. Vale destacar que o mitogenoma de algumas espécies (p. ex. *Hydrophis melanocephalus*) apresentam muitas regiões não anotadas na região do agrupamento de tRNA *WAN-OL-CY* que não foram identificadas como segmentos de regiões duplicadas, e podem ser vestígios do processo de TDRL envolvendo a região OL (KUMAZAWA; NISHIDA, 1995; MACEY et al., 1997).

De modo geral, nossos resultados indicam similaridade ao padrão evolutivo observado em revisões anteriores (KUMAZAWA, 2004; DONG; KUMAZAWA, 2005; DOUGLAS; JANKE; ARNASON, 2006; JIANG et al., 2007; CHEN; ZHAO, 2009; YAN; LI; ZHOU, 2009; OGUIURA; FERRAREZZI; BATISTIC, 2009; QIAN et al., 2018), porém, novos padrões também foram observados.

Nossos resultados indicam que o mitogenoma 1 divergiu anteriormente ao mitogenoma 2, o que concorda com os dados obtidos por Yan et al. (2009). Porém, tais resultados divergem daquele obtido por Qian et al. (2018), no qual o mitogenoma 2 divergiu primeiro, seguido do mitogenoma 1. Ambos os mitogenomas apresentam uma característica em comum, que é a ausência da região OL, que pode estar associada (ou não) ao hábito fossorial desses animais (MIRALLES et al., 2018).

A predominância observada do mitogenoma 3 em Alethinophidia pode estar associada com as altas taxas de diversificação e dispersão desse grupo, observada durante a evolução de Serpentes (KLEIN et al., 2021); suas derivações, a partir dos dados obtidos, ocorrem em espécies específicas, exceto para o mitogenoma 3B e seus derivados (3B1 e 3B3), o mitogenoma 3C, e o mitogenoma 3D e seus derivados (3D1 e 3D2).

O mitogenoma 3B e seus derivados ocorrem exclusivamente na família Viperidae. Esse mitogenoma poderia ter sido originado no episódio de diversificação dessa família, que ocorreu no final do paleogeno (KLEIN et al., 2021), podendo ter coevoluído junto a outras

características específicas de Viperidae. Vale destacar que o mitogenoma 3B3 parece ser específico para *Bothrops* do grupo *jararaca*, porém novos estudos que incorporem outras espécies deste grupo poderão corroborar ou refutar essa hipótese.

O mitogenoma 3C apresenta múltiplas origens – com a primeira em Homalopsidae – e pode estar também associado ao episódio de divergência dessa família durante o final do Paleogeno (KLEIN et al., 2021). Esse mitogenoma aparece novamente na filogenia em Colubridae e Dipsadidae, e pode estar associado com o intenso processo de diversificação dessas famílias no Neogeno (KLEIN et al., 2021).

Por fim, o mitogenoma 3D e seus derivados são observados exclusivamente em espécies de Serpentes marinhas, que, inclusive, apresentam rearranjos cromossômicos, diferenças genômicas e venômicas relacionadas à adaptação ao ambiente em que vive (PENG et al., 2020; LI et al., 2021). Seria possível aventar a possibilidade de que as características específicas dos mitogenomas recuperadas para as espécies marinhas (*E. ijimae* e *Hydrophis* sp.) também poderiam estar associadas à adaptação à vida marinha, embora não seja possível traçar essa correlação direta com os dados obtidos no presente estudo.

5.3. Genética de população de *Bothrops insularis*

A amplificação heteróloga é uma ferramenta molecular que tem sido aplicada em estudos de conservação. O sucesso desse tipo de amplificação se relaciona ao grau de distância filogenética das espécies: quanto mais relacionadas, maior a probabilidade de sucesso (BLOUIN-DEMERS; GIBBS, 2003; MATTSON et al., 2007; SIMONOV; WINK, 2011). No presente estudo, dado que *B. insularis* pertence ao complexo *B. jararaca*, o qual é grupo irmão do complexo *B. neuwiedi* (CARRASCO et al., 2012), foi obtido sucesso de 54,6% de amplificação heteróloga para os microssatélites provenientes de *B. mattogrossensis*, indicando uma melhor performance desses locos do que os locos quando compactados àqueles provenientes de *B. pauloensis* (45,45%) e *B. marmoratus* (9,09%).

Populações isoladas, de ilhas e/ou de espécies criticamente em perigo tendem a apresentar valores baixos de diversidade genética e indícios de endocruzamento quando comparadas com populações amplamente distribuídas e conectadas, do continente e/ou de espécies não ameaçadas (FRANKHAM; BALLOU; BOORE, 2008; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Considerando o número de alelos e a taxa de heterozigose, a

diversidade genética de cada população de *B. insularis* foi menor quando comparada à diversidade genética obtida para espécies do grupo *B. newwiedi* (*B. marmoratus*, *B. mattogrossensis* e *B. pauloensis*; MACHADO, 2015; SILVA et al., em prep.) e outras espécies continentais (p. ex. DUAN et al., 2017).

Os valores de diversidade alélica são similares aos recuperados para outras serpentes em perigo e/ou isoladas em ilhas (MEISTER et al., 2012; WANG et al., 2015; JAEGER et al., 2016). Os valores de heterozigose média encontrados no presente estudo (*ex situ*: $H_o = 0,59$, $H_e = 0,48$; *in situ*: $H_o = 0,53$, $H_e = 0,47$) são similares aos compilados por King (2009) para 24 espécies continentais – representantes de 4 famílias (Colubridae, Natricidae, Viperidae e Boidae) – (0,35 – 0,87/ média: 0,60). Porém, ressalta-se que o loco Bmat_080, apresentou a menor taxa de heterozigose (*ex situ*: H_o e $H_e = 0,09$; *in situ*: $H_o = 0,03$, $H_e = -0,13$), provavelmente, consequência de um processo de fixação do alelo 193 nas populações (Apêndice 12).

As altas taxas de heterozigose observadas em comparação às de heterozigose esperadas podem ser explicadas pela associação de eventos demográficos passados e pela diversidade genética existente nas populações. O efeito fundador e o efeito gargalo são conhecidos como fenômenos que reduzem, aleatoriamente, a diversidade genética das populações, reduzindo o número de alelos e heterozigose (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). No entanto, a redução no número de alelos ocorre em uma velocidade maior do que a redução da heterozigose, o que, em alguns casos, pode levar a uma taxa de heterozigose observada maior do que a esperada, pois a última é baseada na frequência dos alelos na população e na teoria do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (LUIKART; CORNUET, 1998; KING, 2009). Dessa forma, um crescimento constante após um efeito gargalo pode levar a um aumento nas taxas de heterozigose, ainda que exista uma baixa diversidade alélica (ALLENDORF; LUIKART; BOORE, 2013).

Registros da história demográfica de *B. insularis* indicam que a população *in situ* teve um declínio populacional desde sua descoberta até os dias atuais, especialmente nos últimos 20 anos, devido a queimadas e ações antropogênicas. O último censo populacional recuperou uma alta densidade e estabilidade populacional (GUIMARÃES et al., 2015). Portanto, ainda que nossos resultados não recuperem evidências de efeito gargalo recente, possivelmente devido ao número pequeno de marcadores usados, podemos aventar que: as taxas de heterozigose e o baixo número de alelos obtidos neste estudo podem estar relacionados com a ocorrência de

efeitos gargalo nas últimas décadas (ou efeito fundador na população *ex situ*) associados a um crescimento populacional das populações nos últimos anos.

Foram recuperados valores significativos e negativos de coeficiente de endocruzamento de sistema de acasalamento para ambas as populações, sugerindo que o sistema de acasalamento para espécie não é endogâmico. Esse resultado contradiz a tendência observada na literatura, a qual expõe uma tendência ao sistema de acasalamento endogâmico em serpentes continentais (ver KING, 2009). Ainda que as análises para *B. insularis* indiquem que o sistema de acasalamento das duas populações seja exocruzamento, foi recuperado um valor positivo e significativo para o coeficiente de endocruzamento por parentesco para a população *in situ*, o que pode indicar a ocorrência de endogamia nesta população.

Endogamia também foi reportada em outra serpente endêmica e insular, *Gloydus shedaoensis* (WANG et al., 2015). Neste estudo, os autores discutem a possibilidade de a espécie ter desenvolvido estratégia para evitar a endogamia, com base na presença de fluxo gênico das subpopulações estudadas. Da mesma forma, podemos aventar a hipótese de que o sistema de acasalamento por exocruzamento poderia evoluído como uma estratégia de resposta à endogamia em *B. insularis*.

A existência de endogamia pode reduzir a capacidade evolutiva e de sobrevivência (*fitness*) da população, podendo, em alguns casos, levar a um declínio na fecundidade e na taxa de sobrevivência, bem como, alterações sexuais. Estudos reprodutivos de *B. insularis* reportaram a existência de hemiclitoris com diferentes tamanhos em fêmeas (HOGE et al., 1953; KASPEROVICZUS, 2009), menor fecundidade quando comparada a sua parente continental, *B. jararaca* (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013), e altos índices de alterações nas estruturas espermáticas, levando a redução no número de espermatozoides viáveis (SILVA et al., 2015). Os dados gerados nesse estudo podem ser considerados um passo inicial para a associação de informações moleculares com dados reprodutivos de *B. insularis*, ainda que tenham sido utilizados marcadores neutros.

A divergência genética entre as populações pode ser explicada pela presença de alelos privados nas populações, associada ao efeito fundador da população *ex situ* e a amostragem aleatória na população *in situ*, o que pode ter levado à pequena, porém significativa, divergência.

Os resultados recuperados no STRUCTURE sugerem a existência de uma única população, enquanto as análises de DAPC recuperam cinco agrupamentos genéticos distintos, sem correlação com as áreas amostradas. Um estudo recente da raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) de Cascade (do inglês *Cascade red fox*; AKINS; AUBRY; SACKS, 2018) também revelou a ocorrência de agrupamentos genéticos sem correlação geográfica, o que levou os autores a sugerirem a ocorrência de linhagens familiares entre os indivíduos amostrados e, ainda, que a mistura desses agrupamentos no espaço amostrado indicaria a existência de fluxo gênico entre os grupos amostrados. Além disso, análises realizadas para *Gloydus shedaensis* recuperaram a existência de fluxo gênico entre as subpopulações, com indivíduos aparentados recuperados em toda a distribuição geográfica da ilha, indicando que todas as subpopulações devem ser consideradas como uma única unidade para conservação (WANG et al., 2015).

Ainda que essas espécies estudadas possuam diferentes vagilidades, a partir dos resultados obtidos para *B. insularis*, pode aventar que não exista uma estruturação genética entre as populações de *B. insularis* e que os agrupamentos genéticos encontrados no DAPC se devem a: (i) o isolamento da população *ex situ*; e (ii) possível recuperação de agrupamentos familiares na população *in situ*, devido à baixa vagilidade da espécie (K. Banci, comunicação pessoal). Além disso, o fluxo gênico observado entre esses agrupamentos familiares sugere que a ilha deva ser considerada uma única unidade para conservação.

5.4. Genética de *B. insularis* e suas implicações para conservação

Muitos estudos de conservação focam em abordagens *ex situ* sem a integração explícita com a conservação *in situ*. No entanto, estudos recentes destacam a importância do monitoramento *in situ* anteriormente à construção das populações cativas, bem como a integração das duas estratégias (FRANKHAM, 2010; WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2011; CASTELLANOS-MORALES et al., 2016). Por exemplo, na seleção dos indivíduos fundadores para a criação de uma população *ex situ* - a fim de se minimizar efeitos de endocruzamentos e exocruzamentos - (ÚJVARI et al., 2002) e a meta de manter 90 – 95% de similaridade genética entre as populações (FRANKHAM; BOULLE; BOORE, 2008; CASTELLANOS-MORALES et al., 2016).

No presente estudo, foram recuperados somente 49% de similaridade genética entre as duas populações, o que pode ser explicado pela baixa, porém significativa, divergência genética entre as populações e suas frequências alélicas. Por isso, sugere-se: (i) a translocação de

indivíduos da ilha, previamente genotipados, à população cativa; (ii) o estabelecimento de protocolos de cruzamentos baseados em aspectos reprodutivos e genéticos de cada indivíduo, a fim de selecionar pares com qualidade reprodutiva, capazes de manter a similaridade genética entre as populações (*ex situ* e *in situ*), evitar a perda de diversidade genética e a ocorrência de endocruzamento; e (iii) o monitoramento contínuo da diversidade genética das populações. Além disso, recomenda-se a integração dos dados gerados no presente estudo às informações ecológicas e reprodutivas, com o objetivo de guiar pesquisas futuras com a espécie, bem como auxiliar processos de revigoramento (genético e demográfico) e, em último caso, reintroduções.

Diversas estratégias de manejo se propõem a manter a variabilidade genética e evitar ocorrência de endocruzamento e adaptações ao cativeiro - este último especificamente para populações *ex situ*. Fernández e Caballero (2001) apontam que as principais estratégias em um manejo *ex situ* focam: (i) na redução da média de parentesco entre os indivíduos da população; (ii) na redução das consequências do efeito fundador; ou (iii) na combinação de ambas as estratégias. Porém, uma dificuldade no manejo *ex situ* tem sido a ausência de dados referentes ao grau de parentesco dos indivíduos que compõem a população, o que pode levar a erros como a subestimação do grau de parentesco e endogamia na população (JIMÉNEZ-MENA et al., 2015). Os dados obtidos no presente estudo auxiliaram a refutar o parentesco de um possível macho e três descendentes e a identificar a relação entre quatro fêmeas fundadoras e cinco descendentes. A média de parentesco obtida (0,20) sugere que a população *ex situ* é composta por meio-irmãos e indivíduos com menor grau de parentesco (p. ex. primos, tios, sobrinhos, avós), o que se explica pela alta contribuição genética de poucos fundadores (ver apêndice 14). Baseado nos valores de parentesco e nas estratégias supracitadas, foram sugeridos seis pares para cruzamento preferencial na população *ex situ* (Tabela 9).

Estudos têm demonstrado uma correlação da ocorrência de endocruzamentos com a fixação de alelos deletérios, depressão endogâmica e processos de extinção (BROOK et al., 2002; FRANKHAM; BALLOU; BOORE; 2008; ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Portanto, dada a recuperação de um valor positivo e significativo do coeficiente de endocruzamento na população *in situ*, um monitoramento contínuo dos parâmetros genéticos e delimitações de estratégias que evitem a endogamia e a erosão genética dessa população é crucial para garantir o sucesso da conservação *in situ*, bem como para identificar genes que possam estar relacionados ao *fitness* da espécie.

Além das informações de genética de população obtidas e destacadas anteriormente, a prospecção do mitogenoma e do genoma dessa espécie permitiu a compreensão evolutiva e o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para a espécie para a realização de estudos futuros, incluindo a criação de um *toolbox* molecular, que pode ser empregado tanto por cientistas quanto por técnicos que estejam ligados diretamente ao manejo da espécie, conforme indicado por THADEN et al. (2020). Além disso, o aumento no número desses marcadores permitirá a investigação mais robusta das informações genéticas, uma vez que quanto maior o número desses marcadores, melhor a identificação da estruturação genética e da diversidade genética das populações (WANG et al., 2021).

Da mesma forma, a primeira versão do genoma obtido para *B. insularis* pode auxiliar a compreensão evolutiva de características venômicas, sexuais e morfológicas da espécie, conforme realizado para *B. jararaca* (Almeida, 2016), *Python bivittatus* (Castoe et al., 2013) e outras espécies.

As análises evolutivas acerca do mitogenoma de Serpentes permitiram a obtenção de *insights* de processos de história evolutiva de algumas espécies, o que pode auxiliar o processo de conservação. A caracterização do mitogenoma de *B. insularis* e análises comparativas desse mitogenoma com o de outras espécies de *Bothrops* corroboram que *B. insularis* está sofrendo um processo de acúmulos de divergências em decorrência da ausência de fluxo gênico. Desse modo, reforçando sua classificação como uma unidade evolutivamente significativa, trazendo uma nova linha de evidência da sua diversificação e destacando a sua importância de sua Conservação.

Por fim, os mitogenomas espécie-específicos observados podem indicar padrões evolutivos associados a distintas histórias evolutivas sugerindo a importância dessas espécies para que não haja a perda dessa diversidade.

6. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados marcam a introdução de estudos genéticos no auxílio do manejo dessa espécie, demonstrando a importância desses parâmetros para traçar estratégias de conservação. No geral, para se melhorar o manejo das populações de *B. insularis*, sugere-se que: (i) seja monitorada de forma contínua a diversidade genética nas populações; (ii) sejam incorporados novos indivíduos da ilha à população do plantel, a fim de se manter a similaridade

genética entre as duas populações; (iii) seguir os cruzamentos preferenciais, sempre que possível, a fim de que todos os fundadores contribuam geneticamente na população *ex situ*; e (iv) analisar os impactos caso exocruzamentos, translocações, revigoração genético e/ou reintroduções sejam estabelecidos como propósitos da população cativa. A primeira versão do genoma obtido para *B. insularis* marca o início da prospecção genômica de uma segunda espécie brasileira. Além disso, a identificação de regiões repetitivas, permitiu a inferência de 119 *primers* de marcadores microssatélites específicos e perfeitos, que poderão ser empregados em estudos futuros. As análises de evolução mitogenômica de Serpentes sugerem uma maior diversidade de mitogenomas do que reportada previamente (7 mitogenomas reanotados/inéditos), a ocorrência de possíveis rearranjos envolvendo o agrupamento dos tRNA “S2D” e indicam que *B. insularis* seja considerada uma unidade evolutivamente significativa, reforçando a importância de sua conservação.

REFERÊNCIAS

- ADOBE SYSTEM INCORPORATED. 2018. *Adobe Photoshop CC*.
- AKINS, J.R.; AUBRY, K.B.; SACKS, B.N. 2018. Genetic integrity, diversity and population structure of the Cascade red fox. *Conservation Genetics*, 19: 969 – 980p. DOI: 10.1007/s10592-018-1070-y.
- ALENCAR L. R. V.; *et al.* 2016. Diversification in vipers: phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105: 50 – 62p. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.07.029.
- ALFÖLDI, J.; *et al.* 2011. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature*, 477: 587 – 591p. DOI: 10.1038/nature10390.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G.; AITKEN, S.N. 2013. *Conservation and the Genetics of Populations*. 2ªEd. [S.I]: Wiley-Blackwell. 602p.
- ALMEIDA, D. D.; *et al.* 2016. The complete mitochondrial genome of *Bothrops jararaca* (Reptilia, Serpentes, Viperidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 1 (1): 907 – 908p. DOI: 10.1080/23802359.2016.1149783.
- ALMEIDA, D. D.; *et al.* 2021. Tracking the recruitment and evolution of snakes toxins using the evolutionary context provided by the *Bothrops jararaca* genome. *Proceedings of Natural Academy of Science of the United States of America*, 118 (20): e2015159118. DOI: 10.1073/pnas.2015159118.
- AMARAL, A. 1921. Contribuição para o conhecimento de Ophideos do Brasil. A descrição de uma nova espécie. *Memórias do Instituto Butantan*, 1 (1): 18 – 37p.
- AMORIM, L. G. S.; AZEVEDO, C. R.; AZEVEDO, W. S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. 2019. First record of mating of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) in nature, with comments on sexual behaviour. *Herpetology Notes*, 12: 225 – 227p.
- ANDERSON, S.; *et al.* 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457 – 465p.
- ARRUDA, M.P.; COSTA, W.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. 2017. Genetic diversity of the Morato's digger toad, *Proceratophrys moratoi*: spetial structure, gene flow, effective size and need for differential management strategies of populations. *Genetics and Molecular Biology*, 40 (2): 502 – 514p. DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0025.
- ATKIN, N. B.; MATTINSON. W; BEÇAK, S.; OHNO. 1965. The comparative DNA content of 19 species of placental mammals, reptiles, and birds. *Chromosoma*. DOI: 10.1007/BF00285152.
- AZA, 2020. *Species survival plan programs*. Disponível em: <https://www.aza.org/species-survival-plan-programs>. Último acesso em: 19/09/2020.
- BARBO, F. E.; *et al.* 2016. Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. *Zootaxa*, 4097 (4): 511 – 529p. DOI: 10.11646/zootaxa.4097.4.4.
- BAO, W.; KOJIMA, K. K.; KOHANY, O. 2015. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mobile DNA*, 6 (1): 11.
- BARBO, F. E.; GRAZZIONTIN, F. G.; SAZIMA, I.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. 2012. A new and threatened insularis species of lancehead from southeastern Brazil. *Herpetologica*, 68 (3): 418 – 429 p.
- BARBO, F. E.; *et al.* 2022a. Speciation process on Brazilian continental islands, with the description of a new insular lancehead of the genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). *Systematics and Biodiversity*, 20 (1): 1 – 25p.
- BARBO, F. E.; *et al.* 2022b. Isolated by dry lands: integrative analyses unveil the existence of a new species and a previously unknown evolutionary lineage of Brazilian Lanceheads (Serpentes: Viperidae: *Bothrops*) from a Caating moist-forest enclave. *Canadian Journal of Zoology*, 100: 147 – 159p.

- BARNOSKY, A. D.; *et al.* 2011. Has the earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*, 471: 51 – 57p. DOI: 10.1038/nature09678.
- BATAUS, Y.; *et al.* 2011. **Plano de Ação Nacional para a conservação da herpetofauna insular ameaçada de extinção**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (LEMBIO). 124p.
- BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W.; PEREIRA, A. 2003. Somatic pairing, endomitosis and chromosome aberrations in snakes (Viperidae and Colubridae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75 (3): 285 – 300. DOI: 10.1590/s0001-37652003000300004.
- BEÇAK, M. L.; RABELLO-GRAY, M. N.; BEÇAK, W.; SOMA, M.; BATISTIC, R. F.; TRAJTENGERTZ, I. 1990. The W chromosome during the evolution and in sex abnormalities of snakes. DNA content, C banding. In: OLMO, E. *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhauser Verlag: Boston. 221 – 240p.
- BEÇAK, W. 1964. Constituição cromossômica e mecanismo de determinação do sexo em ofídios sulamericanos. I. Aspectos cariotípicos. *Memoórias do Instituto Butantan*, 32: 37 – 78p.
- BENNET, P. M.; OWENS, I. P. F.; NUSSEY, D.; GARNETT, S. T.; CROWLEY, G. M. 2005. Mechanisms of extinction in birds phylogeny, ecology and threats. In: PURVIS, ANDREW AND GITTLEMAN, JOHN L. AND BROOKS, THOMAS M.; eds. *Phylogeny and Conservation*. Cambridge University Press. 317 – 336p.
- BERNT, M.; BRABAND, A.; SCHIERWATER, B.; STADLER, P. F. 2013a. Genetics aspects of mitochondrial genome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 328 – 338p. DOI: 10.1016/j.ympev.2012.10.020.
- BERNT, M.; *et al.* 2013b. A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 352 – 364p. DOI: 10.1016/j.ympev.2013.05.002.
- BIBB, M. J.; ETEN, R. A. V.; WRIGHT, C. T.; WALBERG, M. W.; CLYTON, D. A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *CELL*, 26 (2): 167 – 180p.
- BLOUIN-DERMERS, G., GIBBS, H. L. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black rat snake (*Elaphe obsoleta*). *Molecular Ecology Notes*, 3: 98 – 99p. DOI: 10.1046/j.1471-8286-2003.00363.x.
- BOETZER, M.; HENKEL, C. V.; JANSEN, H. J.; BUTLER, D.; PIROVANO, W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27 (4): 2114 – 2120p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. 2014. TRIMMOMATIC: A flexible trimmer for illumine sequence data. *Bioinformatics*, 30 (15): 2114 – 2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27 (8): 1767 – 1780p. DOI: 10.1093/nar/27.8.1767.
- BRASIL. 1985. Decreto Nº 91.887, De 5 de novembro de 1985. *Diário Oficial da União*, 15. Nov. 1985, seção 1, P. 16187.
- BROOK, B. W.; TONKYN, D. W.; O'GRADY, J. J.; FRANKHAM, R. 2002. Contributing of inbreeding to extinction risk in threatened species. *Conservation Ecology*, 6: 1 – 16p.
- CAI, BO.; GUO, X.; SONG, Z.; JIANG, J. 2020. Next generation sequencing yields a complete mitochondrial genome of the tatar sand boa (*Eryx tataricus*) from Junggar Basin. *Mitochondrial DNA B Resource*, 5 (1): 731 – 732p. DOI: 10.1080/23802359.2020.1715279.
- CAMACHO, L.M.D. 2016. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysoleaena obovata* (Asteraceae)**. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. 128p.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. 2004. *The venomous reptiles of western hemisphere*. Vol. 1. Ed. 1. Cornell University Press. 476p.

- CARD, D.C.; *et al.* 2016. Phylogeographic and population genetic analyses reveal multiple species of boa and independent origins of insular dwarfism. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102: 104 – 116p. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.05.034.
- CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. L.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. 2012. Morphology, phylogeny and taxonomy of south american bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, 41(2): 109 – 124p. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x.
- CASTELLANOS-MORALES, G.; GUTIÉRREZ-GUERRERO, Y. T.; GÁMEZ, N.; EGUIARTE, L. E. 2016. Use of molecular and environmental analyses for integrated in situ and ex situ conservation: the case of the mexican prairie dog. *Biological Conservation*, 204: 284 – 295p. DOI: 10.1016/j.biocon.2016.10.036.
- CASTOE, T. A.; *et al.* 2009a. Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (22): 8986 – 8991p. DOI: 10.1073/PNAS.0900233106.
- CASTOE, T. A.; *et al.* 2009b. Dynamic nucleotide mutation gradients and control regions usage in squamate reptile mitochondrial genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 127: 112 – 127p. DOI: 10.1159/000295342.
- CASTOE, T. A.; *et al.* 2011. Sequencing the genome of the Burmese python (*Python molurus bivittatus*) as a model for studying extreme adaptations in snakes. *Genome Biology*, 12 (7): 406. DOI: 10.1186/gb-2011-12-7-406.
- CASTOE, T. A.; *et al.*, 2013. The Burmese oython genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1 (5): e1400253. DOI: 10.1073/pnas.1314475110.
- CEBALLOS, G.; EHRlich, P. R.; BARNOSKY, A. D.; GARCÍA, A.; PRINGLE, R. M.; PALMER, T. M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1 (5): e1400253. DOI: 10.1126/sciadv.1400253.
- CHEN, N.; LAI, X. P. 2010. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of the king cobra, *Ophiophagus hannah* (Serpentes: Elapidae). *Hereditas*, 32 (7): 719 – 725p. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00719.
- CHEN, N.; ZHAO, S. 2009. New progress in snake mitochondrial gene rearrangement. *Mitochondrial DNA*, 20 (4): 64 – 71p. DOI: 10.1080/19401730902964433.
- COLLEN, B.; *et al.* 2011. Predicting how populations decline to extinction. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 366: 2577 – 2586p. DOI: 10.1098/rstb.2011.0015.
- DING, C.; ZHOU, B. GUO, H.; DUAN, Y.; WANG, Z. 2016. Sequencing and analysis of mitochondrial genome of *Elaphe carinata* (Reptilia, Squamata, Colubridae). *Mitochondrial DNA Part B*, 1 (1): 41 – 42p. DOI: 10.1080/23802359.2015.1137813.
- DING, M.; WU, J.; QIAN, L.; PAN, T.; ZHANG, B. 2016. Complete mitochondrial genome of *Lycodon flavozonatum* and implications for colubridae taxonomy. *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (5): 3473 – 3474p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1066354.
- DONG, S.; KUMAZAWA, Y. 2005. Complete mitochondrial dna sequences of six snakes: phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. *Journal of Molecular Evolution*, 61: 12-22. DOI:10.1007/s00239-004-0190-9.
- DOUGLAS, D. A.; JANKE, A.; ARNASON, U. 2006. A mitogenomic study on the phylogenetic position of snakes. *Zoologica Scripta*, 33 (6): 545 – 558p. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2006.00257.x.
- DU, L.; *et al.* 2018. KRAIT: an ultrafast tool for genome-wide survey of microsatellites and primer design. *Bioinformatics*, 34 (4): 681 – 683p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx665.
- DUAN, Y.; *et al.* 2017. Genetic diversity and population genetic structure of *Python bivittatus* in China. *Journal of Forest Research*, 28 (3): 651 – 658p. DOI: 10.1007/s11676-016-0308-0.

- DUARTE, M.R.; PUORTO, G; FRANCO, F.L. 1995. A biological survey of pitpiver *Bothrops insularis* Amaral (Serpentes, Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 30 (1): 1 – 13p. DOI: 10.1080/0165059509360936.
- DUBEY, B.; MEGANATHAN, P. R.; HAQUE, I. 2012. Complete mitochondrial genome sequence from a endangered Indian snake, *Python molurus molurus* (Serpentes, Pythonidae). *Molecular Biology Reports*, 39: 7403 – 7412p. DOI: 10.1007/s11033-02-1572-5.
- DUTRA, N. C. L.; TELLES, M. P. C.; DUTRA, D. L.; SILVA JÚNIOR, N. J. 2008. Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 in central Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 603 – 613p. DOI: 10.4238/vol7-3gmr413.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2): 359 – 361p. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- EARL, S. T.; *et al.* 2006. Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. *Proteomics*, 6 (24): 6554 – 6565p. DOI: 10.1002/pmic.200600263.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32 (5): 1792 – 1797p. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14 (8): 2611 – 2620p. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. 2001. A comparison of management strategies for conservation with regard to population fitness. *Conservation Genetics*, 2: 121 – 131p. DOI: 10.1023/A:1011830703723.
- FOLT, B.; *et al.* 2019. Taxonomic and conservation implications of population genetic admixture, mito-nuclear discordance, and male-biased dispersal of a large endangered snake, *Drymarchon couperi*. *Plos One*, 14 (3): E0214439. DOI: 10.1371/journal.pone.0214439.
- FRANKHAM, R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, 143: 1919 – 1927p. DOI: 10.1016/j.biocon.2010.050.011.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D; BRISCOE, D.A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. 1ª Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 262p.
- FUJITA, M. K.; BOORE, J. L.; MORITZ, C. 2007. Multiple origins and rapid evolution of duplicated mitochondrial genes in parthenogenetic Geckos (*Heteronotia binoei*; Squamata, Gekkonidae). *Molecular Biology and Evolution*, 24 (12): 2775 – 2786p. DOI: 10.1093/molbev/msm212.
- GAO, D.; LIU, C.; HAO, S. 2018. Characterization of the complete mitochondrial genome of the European adder (*Vipera berus*) using Illumina sequencing technology. *Conservation Genetics Resources*, 10: 793 – 796p. DOI: 10.1007/s12686-017-0932-9.
- GALLEGO-GARCÍA, N.; VARGAS-RAMÍREZ, M.; FORERO-MEDINA, G.; CABALLERO, S. 2018. Genetic evidence of fragmented populations and inbreeding in the Colombian endemic Dahl's toad-headed turtle (*Mesoclemmys dahli*). *Conservation Genetics*, 19: 221 – 233p. DOI: 10.1007/s10592-017-1021-z.
- GONG, Y. A.; PENG, L. F.; LU, S. Q.; HUANG, S. 2019. The complete mitochondrial genome of *Lycodon ruhstrati* (Serpentes: Colubridae). *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (2): 2165 – 2166p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1623730.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, Version. 2.9.3.2.
- GOUDET, J. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical f-statistics. *Molecular Ecology Note*, 5 (1): 184 – 186p. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x.
- GRAY, M. W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology*, 5: 25 – 50p. DOI: 10.1146/annurev.cb.05.110189.000325.

- GRAY, M. W. 2012. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect in Biology*: 4 (9): a011403. DOI: 10.1101/cshperspect.a011403.
- GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian atlantic forest. *Molecular Ecology*, 15 (13): 3969 – 3982p. DOI: j.1365-294X.2006.03057.x.
- GUIMARÃES, M.; MUNGULA-STEYER, R.; DOHERTY, P. F.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. 2014. Population dynamic of the critically endangered golden lancehead pitviper, *Bothrops insularis*: stability or decline? *Plos One*, 9 (4): E95203. DOI: 10.1371/journal.pone.0095203.
- HALL, J. B.; COBB, V. A.; CAHOON, A. B. 2013. The complete mitochondrial dna sequence of *Crotalus horridus* (timber rattlesnake). *Mitochondrial DNA*, 24 (2): 94 – 96p. DOI: 10.3109/19401736.2012.722999.
- HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (21): 6465 – 6469p. DOI:10.1073/pnas.79.21.6465.
- HAMDAN, B.; GUEDES, T. B.; CARRASCO, P. A.; MELVILLE, J. 2020. A complex biogeographic history of diversification in neotropical lancehead pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, 49: 145 – 158p. DOI: 10.1111/zsc.12398.
- HAN, X.; ZHAO, S.; XU, C. 2016. Sequence and organization of the complete mitochondrial genome of the Ussuri mamushi (*Gloydus ussuriensis*). *Mitochondrial Dna Part A*, 27 (4): 2617 – 2618p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1041121.
- HARLEY, E. H.; WAAL, M.; MURRAY, S.; O'RYAN, C. 2016. Comparison of the whole mitochondrial genome sequences of northern and southern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum*): the conservation consequences of species definitions. *Conservation Genetics*, 17: 1285 – 1291p. DOI: 10.1007/s10592-016-0861-2.
- HAUTMANN, M. 2012. Extinction: End-Triassic Mass Extinction. S.I. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001655.pub3.
- HE, M.; FENG, J.; ZHAO, E. 2010. The complete mitochondrial genome of the Sichuan hot-spring keel-back (*Thermophilis zhaoermii*; Serpentes: Colubridae) and a mitogenomic phylogeny of the snakes. *Mitochondrial DNA*, 21 (1): 8 – 18p. DOI: 10.3109/19401730903505867.
- HEDRICK, P. W.; ROBINSON, J. Á.; PETERSON, R. O.; VUCETICH, J.A. 2019. Genetics and extinction and the examples of Isle Royale wolves. *Animal Conservation*, 22 (3): 302 – 309p. DOI: 10.1111/acv.12479.
- HENDRICKS, S. A.; SCHWEIZER, R. M.; WAYNE, R. K. 2019. Conservation genomics illuminates the adaptive uniqueness of North American gray wolves. *Conservation Genetics*, 20: 29 – 43p. DOI: 10.1007/s10592-018-1118-z.
- HOGUE, A., BELLUOMINI, H., SCHREIBER, G. 1953. Intersexuality in a highly isolated population of snakes. Atti del IX Congresso Internazionale di Genetica. *CARYOLOGIA*, 1: 964 – 965p.
- HOSHINO, A.A.; BRAVO, J.P.; NOBILE, P.M.; MORELLI, K.A. 2012. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. IN: *Genetic diversity in microorganisms*, PROF. MAHMUT CALISKAN, IN TECH: 149 – 170p.
- HUANG, X.; YANG, D.; ZHANG, L.; ZHANG, B. 2014a. Mitochondrial genome of *Protobothrops maolanensis* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 25 (6): 445 – 446p. DOI: 10.3109/19401736.2013.809445.
- HUANG, X.; YANG, D.; ZHANG, L.; ZHANG, B. 2014b. Mitochondrial genome of *Protobothrops mangshanensis* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 25 (6): 435 – 436p. DOI: 10.3109/19401736.2013.809445.

- HUANG, X.; ZHANG, L.; PAN, T.; ZHANG, B. 2014c. Mitochondrial genome of *Protobothrops dabieshanensis* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 25 (5): 337 – 338p. DOI: 10.3109/19401736.2013.803543.
- HUANG, X.; *et al.* 2013. Mitochondrial genome of *Protobothrops jerdonii* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 24 (3): 225 – 227p. DOI: 10.3109/19401736.2012.752474.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. 2018a. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. 1ª Ed. Brasília, DF: ICMBio/MMA.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. 2018b. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume IV – Répteis*. 1ª Ed. Brasília, DF: ICMBio/MMA.
- IUCN (INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). 2002. Technical guidelines on the management of ex situ populations for conservation. < <https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/rep-2002-017.pdf>> Último acesso em: 19/ 09/ 2020.
- IUCN (INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). 2020a. <<http://iucn.org>> Último acesso em: 12/12/2020.
- IUCN (INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). 2020b. *Red List of threatened species – Bothrops insularis (Golden Lancehead, Queimada Island Bothrops)*. <<http://www.iucnredlist.org/details/2917/0>> Último acesso em: 25/02/2020.
- JABLONSKI, D.; SOLTYS, K.; KUKUSHKIN, O. V.; SIMONOV, E. 2019. Complete mitochondrial genome of the blotched snake, *Elaphe sauromates* (Pallas, 1814). *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (1): 468 – 469p. DOI: 10.1080/23802359.2018.1551083.
- JABLONSKI, D.; SOLTYS, K.; SIMONOV, E. 2019. Complete mitochondrial genome of the four-lined snake, *Elaphe quatuorlineata* (Bonnaterre, 1790). *Mitochondrial Dna Part B*, 40 (1): 897 – 898p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1573121.
- JACOBSEN, M. W.; FONSECA, R. R.; BERNATCHEZ, L.; HANSEN, M. M. 2016. Comparative analysis of complete mitochondrial genomes suggests that relaxed purifying selection is driving high nonsynonymous evolutionary rate of the NADH2 gene in whitefish (*Coregonus* spp.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95: 161 – 170p. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.11.008.
- JAEGER, C. P.; *et al.* 2016. Microsatellite and major histocompatibility complex variation in an endangered rattlesnake, the Eastern Massasauga (*Sistrurus catenatus*). *Ecology and Evolution*, 6 (12): 3991 – 4003p. DOI: 10.1002/ece3.2159.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23 (14): 1801 – 1806p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm233.
- JANES, J. K.; *et al.* 2017. The K=2 conundrum. *Molecular Ecology*, 26 (14): 3594 – 3602p. DOI: 10.1111/mec.14187.
- JANG, K. H.; HWANG, U. W. 2011. Complete mitochondrial genome of the black-headed snake *Sibynophis collaris* (Squamata, Serpentes, Colubridae). *Mitochondrial DNA*, 22 (4): 77 – 79p. DOI: 10.3109/19401736.2011.624601.
- JIANG, Z. J.; *et al.* 2007. Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region. *BMC Evolutionary Biology*, 7 (123): S.I. DOI: 10.1186/1471-2148-7-123.
- JIMÉNEZ-MENA, B.; SCHAD, K.; HANNA, N.; LACY, R. C. 2015. Pedigree analysis for the genetic management of group-living species. *Ecology and Evolution*, 6 (10): 3067 – 3078p. DOI: 10.1002/ece3.1831.
- JOMBART, T. 2008. Adegnet: a R package for multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24 (11): 1403 – 1405p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn129.

- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11 (94): 1 – 15p. DOI: 10.1186/1471-2156-11-94.
- JÜHLING, F.; *et al.* 2012. Improved systematic tRNA gene annotation allows new insights into the evolution of mitochondrial tRNA structures and into the mechanism of mitochondrial genome rearrangements. *Nucleic Acid Research*, 40 (7): 2833 – 2845p. DOI: 10.1093/nar/gkr1131.
- KAERSE, M.; *et al.* 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12): 1647 – 1649p. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- KAJITANI, R.; *et al.*, 2019. Platanus-alley is a de novo haplotype assembler enabling a comprehensive access to divergent heterozygous regions. *Nature communications*, 10 (1): 1 – 5p.
- KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6 (2): 576 – 579p. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x.
- KALVARI, I.; *et al.* 2020. Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Research*, 49 (D1): 192 – 200. DOI: 10.1093/nar/gkaa1047.
- KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B. Q.; WONG, T. K. F.; HAESELER, A. V.; JERMIIN, L. S. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14: 587 – 589p. DOI: 10.1038/nmeth.4285.
- KAMVAR, Z. N.; BROOKS, J. C.; GRUNWALD, N. J. 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontier in Genetics*, 6 (208): S.I. DOI: 10.3389/fgene.2015.00208.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRUNWALD, N. J. 2014. Poppr: a R package for genetic analysis of population with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2: e281. DOI: 10.7717/peerj.281.
- KANG, X.; *et al.* 2017. The complete mitochondrial genome of *Protobothrops kaulbacki* (Squamata: Viperidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 2 (1): 201 – 202p. DOI: 10.1080/23802359.2017.1307703.
- KASPEROVICZUS, K. N.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. 2012. Instituto Butantan e a jararaca-ilhoa: cem anos de história, mitos e ciência. *Cadernos de História da Ciência do Instituto Butantan*, 7 (2): 255 – 269p.
- KASPEROVICZUS, K. N. 2009. *Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa Bothrops insularis (Serpentes: Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo*. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- KIM, I. H.; *et al.* 2018. Phylogenetic relationships of three representative sea krait species (genus *Laticauda*; Elapidae; Serpentes) based on 13 mitochondrial genes. *Mitochondrial Part A*, 29 (5): 772 – 777p. DOI: 10.1080/24701394.2017.1357710.
- KIM, J. G.; *et al.* 2020. The complete mitochondrial genome of a yellow-bellied sea snake (*Hydrophis platurus*) (Squamata, Elapidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 5 (1): 891 – 892p. DOI: 10.1080.23802359.2020.1717385.
- KING, R. B. 2009. Population and conservation genetics. IN: S. J. MULLIN; R. A. SIEGEL. *SNAKES: Ecology and Conservation*. 1ª Ed. CORNELL UNIVERSITY. 78 – 122p.
- KISHIDA, T.; *et al.* 2019. Loss of olfaction in sea snakes provides new perspectives on the aquatic adaptation of amniotes. *Proceedings of the Royal Society B*, 286: 20191828. DOI: 10.1098/rspb.2019.1828.
- KLEIN, C. G.; *et al.* 2021. Evolution and dispersal of snakes across the Cretaceous-Paleogene mass extinction. *Nature Communications*, 12: 5335. DOI: 10.1038/s41467-021-25136-y.
- KORNILIOS, P. 2019. The complete mitogenome of the eurasian blindsnake *Xerotyphlops vermicularis* (Reptilia, Typhlopidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (1): 1990 – 1991p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1617080.

- KÜCK, P.; MEUSEMANN, K. 2010. FASconCAT: convenient handling of data matrices. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 (3): 1115 – 1118p. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.04.024.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6): 1547 – 1549p. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- KUMAZAWA, 2004. Mitochondrial DNA sequences of five squamates: phylogenetic affiliation of snakes. *DNA Research*, 11: 137 – 144p. DOI: 10.1093/dnares/11.2.137.
- KUMAZAWA, Y.; ENDO, H. 2004. Mitochondrial Genome of the Komodo dragon: efficient sequencing method with reptile-oriented primers and novel gene rearrangements. *DNA Research*, 11: 115 – 125p.
- KUMAZAWA, Y.; NISHIDA, M. 1995. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Molecular Biology and Evolution*, 12 (5): 759 – 772p. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040254.
- KUMAZAWA, Y.; OTA, H.; NISHIDA, M.; OZAWA, T. 1996. Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 1242 – 1254p. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025690.
- KUMAZAWA, Y.; OTA, H.; NISHIDA, M.; OZAWA, T. 1998. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*, 150: 313 – 329p.
- KURABAYASHI, A.; *et al.* 2008. Phylogeny, recombination, and mechanism of stepwise mitochondrial genome reorganization in Mantellid frogs from Madagascar. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (5): 874 – 891p. DOI: 10.1093/molbev/msn031.
- LANDER, E. S.; WATERMAN, M. S. 1988. Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. *Genomics*, 2 (3): 231 – 239p. DOI: 10.1016/0888-7543(88)90007-9.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9 (4): 357 – 359p. DOI: 10.1038/nmeth.1923.
- LARSON, S. 2012. Loss of genetic diversity in wild populations. IN: *Analysis of Genetic Variation in Animals*. Prof. Mahmut Caliskan, In Tech. 231 – 342p. DOI: 10.5772/33654.
- LARSSON, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30 (22): 3276 / 3278. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu531.
- LAVROV, D. V. 2007. Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. *Integrative and Comparative Biology*, 47 (5): 734 – 743p. DOI: 10.1093/icb/icm045.
- LAWLER, J. J.; *et al.* 2006. Conservation science: a 20-year report card. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4 (9): 473 – 480p. DOI: 10.1890/1540-9295(2006)4[473:CSAYRC]2.0.CO;2.
- LELE, A.; RAND, M.; ZWEIFEL, S. G. 2016. Sequencing and analysis of the mitochondrial genome of *Pituophis catenifer sayi* (Squamata: Colubridae). *Mitochondrial Dna Part B*, 1 (1): 483 – 484p. DOI: 10.1080/23802359.2016.1192497.
- LI, A.; *et al.*, 2021. Two Reference-Quality Sea Snake Genomes Reveal Their Divergent Evolution of Adaptive Traits and Venom Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 38 (11): 4867 – 4883p. DOI: 10.1093/molbev/msab212.
- LI, E.; *et al.* 2014. The complete mitochondrial genome of *Oocatochus rufodorsatus* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *Mitochondrial Dna Part A*, 25 (6): 449 – 450p. DOI: 10.3109/19401736.2013.814116.
- LI, E.; SUN, F.; ZHANG, R.; CHEN, J.; WU, X. 2016. The complete mitochondrial genome of the striped-tailed rat-snake *Orthriophis taeniurus* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *Mitochondrial Dna Part A*, 27 (1): 599 – 600p. DOI: 10.3109/19401736.2014.908364

- LI, J. T.; *et al.* 2018. Comparative genomic investigation of high-elevation adaptation in ectothermic snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (33): 8406 – 8411p. DOI: 10.1073/pnas.1805348115.
- LI, Y.; *et al.* 2013. *Gene*, 517: 169 – 178p. DOI: 10.1016/j.gene.2012.12.096.
- LIIT, M.; LUTY, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 (3): 397 – 401p.
- LIU, P.; ZHAO, W. G. 2016. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Elaphe anomala* (Squamata Colubridae). *Mitochondrial Dna Part A*, 27 (4): 2742 – 2743p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1046174.
- LIU, Q.; *et al.* 2016. The complete mitochondrial genome sequence of *Gloydus shedaoensis* (Squamata: Viperidae). *Mitochondrial Dna Part A*, 27 (6): 4679 – 4680p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1106499.
- LUIKART, G.; CORNUET, J. M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked population from alleles frequency data. *Conservation Biology*, 12 (1): 228 – 237p. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1998.96388.x.
- LUKOSCHEK, V.; WAYCOTT, M.; KEOGH, J.S. 2018. Relative information content of polymorphic microsatellites and mitochondrial DNA for inferring dispersal and population genetic structure in the olive sea snake, *Aipysurus laevis*. *Molecular Ecology*, 17 (13): 3062 – 3077p. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03815.x.
- MABUCHI, K.; MIYA, M.; SATOH, T. P.; WESTNEAT, M. W.; NISHIDA, M. 2004. Gene rearrangements and evolution of tRNA pseudogenes in the mitochondrial genome of the Parrotfish (Teleostei: Perciformes: Scaridae). *Journal of Molecular Evolution*, 59: 287 – 297p. DOI: 10.1007/s00239-004-2621-z.
- MACCALLUM, I.; *et al.*, ALLPATHS 2: small genomes assembled accurately and with high continuity from short paired reads. *Genome biology*, 10 (10): R103.
- MACEY, J. R.; LARSON, A.; ANANJEVA, N. B.; FANG, Z.; PAPENFUSS, T. J. 1997. Two novel gene orders and the role of the light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, 14 (1): 91 – 104p.
- MACHADO, A.B.M.; MARTINS, C.S.; DRUMMOND, G.M. (2016). *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- MACHADO, T. 2015. *Filogenia e filogeografia do grupo Bothrops neuwiedi (Serpentes, Squamata)*. Tese, Universidade De São Paulo, São Paulo, Brazil. 184p.
- MADSEN, T.; *et al.* 2000. Population size and genetic diversity in sand lizards (*Lacerta agilis*) and adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation*, 94 (2): 257 – 262p. DOI: 10.1016/S0006-3207(99)00127-5.
- MAGALHÃES, A.M. 2015. *Caracterização das fisionomias vegetais da Ilha da Queimada Grande – Itanhaém/SP, como subsídio à elaboração do plano de manejo da Área de Relevante Interesse Ecológico das Ilhas Queimada Pequena e Queimada Grande*. Dissertação – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/ Escola Nacional de Botânica Tropical. 51p.
- MARÇAIS, G.; KINGSFORD, C. 2011. A fast lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27 (6):764 – 770p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr011.
- MARQUES, O. A. V.; KASPEROVISCZUS, K.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. 2013. Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, southeast Brazil. *Journal of Herpetology*, 47(3): 393 – 399p. DOI: 10.1670/11-267.
- MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M.; DEVELEY, P. F.; MACARRÃO, A.; SAZIMA, I. 2012. The golden lancehead *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) relies on two seasonally plentiful bird species visiting its island habitat. *Journal of Natural History*, 46 (13-14): 885 – 895p. DOI: 10.1080/00222933.2011.654278.

- MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. 2002. A new insular species of pitiviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). *Herpetologica*, 58 (3): 303 – 312p. DOI: 10.1655/0018-0831(2002)058[0303:ANISOP]2.0.CO;2.
- MARTINS, M.; MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I. 2002. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. IN: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing. 307 – 328p.
- MARTINS, M.; SAWAYA, J.; MARQUES, O.A.V. 2008. A first estimate of the population size of the critically endangered lancehead, *Bothrops insularis*. *South American Journal of Herpetology*, 3 (2): 168 – 174p. DOI: 10.2994/1808-9798(2008)3[168:AFEOTP]2.0.CO;2.
- MATTSON, K. J.; *et al.* 2007. Successful artificial insemination in the corn snake *Elaphe guttata* using fresh and cooled semen. *Zoo Biology*, 26: 363 – 369p. DOI: 10.1002/zoo.20144.
- MAURO, D. S.; GOWER, D.; ZARDOYA, R.; WILKINSON, M. 2006. A hotspot of gene order rearrangement by Tandem Duplication and Random Loss in the Vertebrate Mitochondrial Genome. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (1): 227 – 234p. DOI: 10.1093/molbev/msj025.
- MCALILEY, L. R.; WILLIS, R. E., IVANYI, C.; DENSMORE, L. D. III. 2016. Captive breeding of the endangered San Esteban Chuckwalla, *Sauromalus varius*: effects of a decade of captive breeding on maintaining genetic diversity. *The Southwestern Naturalist*, 61 (4): 279 – 285p. DOI: 10.1894/0038-4909-61.4.279.
- MCGLOTHLIN, J. W.; *et al.* 2014. Parallel evolution of tetrodotoxin resistance in three voltage-gated sodium channel genes in the Garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 31 (11): 2839 – 2846p. DOI: 10.1093/molbev/msu237.
- MCLENNAN, E. A.; *et al.* 2018. Pedigree reconstruction using molecular data reveals an early warning sign of gene diversity loss in an island population of Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*). *Conservation Genetics*, 19: 439 – 450p. DOI: 10.1007/s10592-017-1017-8.
- MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. 2011. Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11 (1): 5 – 18p. 10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x.
- MEISTER, B.; URSENBACHER, S.; BAUR, B. 2012. Grass snake population differentiation over different geographic scales. *Herpetologica*, 68 (1): 134 – 145p. DOI: 10.1655/HERPETOLOGICA-D-11-00036.1.
- MICHAELIDES, S.; COLE, N.; FUNK, S. M. 2015. Translocations retains genetic diversity of a threatened endemic reptile in Mauritius. *Conservation Genetics*, 16: 661 – 672. DOI: 10.1007/s10592-014-0691-z.
- MIRALLES, A.; *et al.* 2018. Molecular evidence for the paraphyly of Scolecophidia and its evolutionary implications. *Journal of Evolutionary Biology*, 31: 1782 – 1793p. DOI: 10.1111/jeb.13373.
- MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M.A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1 (1): 19 – 35p. DOI: 10.3390/d1010019.
- MONZÓN-ARGÜELLO, C.; *et al.* 2015. Snakes on an island: independent introductions have different potentials for invasion. *Conservation Genetics*, 16: 1225 – 1241p. DOI: 10.1007/s10592-015-0734-0.
- MUELLER, R. L.; BOORE, J. L. 2005. Molecular mechanisms of extensive mitochondrial gene rearrangement in Plethodontid Salamanders. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (10): 2104 – 2112p. DOI: 10.2093/molbev/msi204.
- MULCAHY, D. G.; MACEY, J. R. 2009. Vicariance and dispersal form a ring distribution in nightsnakes around the gulf of California. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53 (2): 537 – 546p. DOI: 10.1016/J.YMPEV.2009.05.037.
- MULCAHY, D. G.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, J. E.; AGUIRRE-LEÓN, G.; CERVANTES-PASQUALLI, J. A.; ZUG, G. R. 2014. Rediscovery of an endemic vertebrate from the remote islas Revillagigedo in the eastern

- Pacific Ocean: The Clarión nightsnake lost and found. *Plos One*, 9 (5): e97682. DOI: 10.1371/journal.pone.0097682.
- MURRAY, K. A.; ROSAUER, D.; MCCALLUM, H.; SKERRATT, L. F. 2011. Integrating species traits with extrinsic threats: closing the gap between predicting and preventing species declines. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 1515 – 1523p. DOI: 10.1098/rspb.2010.1872.
- MYERS, E. A.; MULCHAHY, D. G. 2020. Six additional mitochondrial genomes for the North American nightsnakes (Dipsadidae: Hypsiglena) and a novel gene feature for advanced snakes. *Mitochondrial Dna B Resource*, 5 (3): 3074 – 3076p. DOI: 10.1080/23802359.2020.1797573.
- NAVEGA-GONÇALVES, M. E. C.; PORTO, T. 2016. Snake conservation in Brazilian biomes. *Bioikos*, 30 (1): 55 – 76p.
- NCBI RESOURCE COORDINADORS. 2016. National Center for Biotechnology Information (ncbi). Bethesda (md): national library of medicine (us), national center for biotechnology information; [1988]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > Último acesso em: 22/01/2021.
- NEI, M. 2005. Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (12): 2318 – 2342p. DOI: 10.1093/molbev/msi242.
- NGUYEN, N. T.; SCHMIDT, H. A.; HAESELER, A. V.; MINH, B. Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 268 – 274p. DOI: 10.1093/molbev/msu300
- OH, D. J.; *et al.* 2015. Mitochondrial genome sequence of *Sibynophis chinensis* (Squamata, Colubridae). *Mitochondrial DNA*, 26 (2): 315 – 316p. DOI: 10.3109/19401736.2013.830290.
- OGUIURA, N.; FERRAREZZI, H.; BATISTIC, R. F. 2009. Cytogenetics and molecular data in snakes: a phylogenetic approach. *Cytogenetic and genome research*, 127 (2 – 4): 128 – 142p. DOI: 10.1159/000295789.
- PAKULL, B.; *et al.* 2019. Genetic diversity and differentiation among the species of African mahogany (*Khaya* spp.) based on a large SNP array. *Conservation Genetics*, 20: 1035 – 1044p. DOI: 10.1007/s10592-019-01191-3.
- PARADIS, E. 2010. Pegas: a R package for population genetics with and integrated – modular approach. *Bioinformatics*, 26 (3): 419 – 420p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp696.
- PASQUESI, G. I. M.; *et al.*, 2018. Squamate reptiles challenge paradigms of genomic repeat element evolution set by birds and mammals. *Nature Communications*, 9: 2774. DOI: 10.1038/s41467-018-05279-1.
- PASSOS, J. 2018. Influência no crescimento de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca*: a dieta pode interferir no tamanho da maturidade sexual em cativeiro? Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 66p.
- PENG, L. F.; WENG, S. Y.; YANG, D. C.; LU, C. H.; HUANG, S. 2016. Complete mitochondrial genome of the Xianggelila hot-spring snake *Thermophis shangrila* (Reptilia, Colubridae). *Mitochondrial Dna B Resource*, 1 (1): 536 – 537p. DOI: 10.1080/23802359.2016.1197072.
- PENG, L.; YANG, D.; DUAN, S.; HUANG, S. 2017. Mitochondrial genome of the Common burrowing snake *Achalinus spinalis* (Reptilia: Xenodermatidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 2 (2): 571 – 572p. DOI: 10.1080/23802359.2017.1365643.
- PENG, C.; *et al.* 2020. The Genome of Shaw’s Sea Snake (*Hydrophis curtus*) reveals secondary adaptations to its marine environment. *Molecular Biology and Evolution*, 37 (6): 1744 – 1760p. DOI: 10.1093/molbev/msaa043.
- PEREIRA, S. L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (4): 745 – 752p. DOI: 10.1590/S1415-47572000000400008.

- PERNA, N. T.; KOCHER, T. D. 1995. Àtterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41 (3): 353 – 358p. DOI: 10.1007/BF00186547.
- PHILLIPS, N. R.; SIMPKINS, J. W.; ROBY, R. K. 2014. Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer’s brains: A review. *Alzheimer’s & Dementia*, 10: 393 – 400p. DOI: 10.1016/j.jalz.2013.04.508.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity*, 90 (4): 502 – 503p. DOI: 10.1093/jhered/90.4.502.
- PORRAS-HURTADO, L.; RUIZ, Y.; SANTOS, C.; PHILLIPS, C.; CARRAEDO, A.; LAREU, M. V. 2013. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4: 98. DOI: 10.3389/fgene.2013.00098.
- PRADA, C. F.; BORRE, J. L. 2019. Gene annotation erros are common in the mammalian mitochondrial genomes database. *BMC Genomics*, 20 (1): 73. DOI: 10.1186/s12864-019-5447-1.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. 2001. *Biologia da Conservação*. 1ª Ed. Londrina, MIDIOGRAF. 328p.
- PRJIBELSKI, A.; ANTIPOV, D.; MELESHKO, D.; LAPIDUS, A.; KOROBENNIKOV, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70 (1): e102.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945 – 959p.
- PURVIS, A.; JONES, K. E.; MACE, G. M. 2000. Extinction. *BioEssays*, 22: 1123 – 1133p.
- QIAGEN TEAM. 2020. *CLC Genomics Workbench* Version 11.0.1. <<https://digitalinsights.qiagen.com>>. Último acesso em: 22/01/2021.
- QIAN, L.; *et al.* 2018. Multiple independent structural dynamic events in the evolution of snake mitochondrial genomes. *BMC Genomics*, 19: 354. DOI: 10.1186/S12864-018-4717-7.
- QIU, Q.; *et al.* 2019. Next-generation sequencing yields the complete mitogenome of the shaw's sea-snake (Squamata: Elapidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (2): 3628 – 3629p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1676667.
- QIU, Q.; *et al.* 2019. Next-generation sequencing yields the complete mitogenome of the blue-banded sea snake (Squamata: Elapidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (2): 2328 – 2329p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1630334.
- R CORE TEAM. 2018. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0.
- RAMBAUT, 2018. *FIGTREE Version 1.4.4*.
- RAYMONT, M.; ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (VERSION 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86 (3): 248 – 249p. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
- REYNOLDS, R. G.; *et al.* 2015. Large divergence and low diversity suggest genetically informed conservation strategies for the endangered virgin islands Boa (*Chilabothrus monensis*). *Global Ecology and Conservation*, 3: 487 – 502p. DOI: 10.1016/j.gecco.2015.02.
- RICE, W. T. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, 43 (1): 223 – 225p. DOI: 10.2307/2409177.
- RODRIGUES, M. T. 2005. The conservation of brazilian reptiles: challenges for a megadiverse country. *Conservation biology*, 19 (3): 659 – 664p. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2005.00690.x.
- RODRIGUEZ, D.; FORSTNER, M. R. J.; MCBRIDE, D. L.; DENSMORE, L. D. III.; DIXON, J. R. 2012. Low genetic diversity and evidence of population structure among subspecies of *Nerodis harteri*, a threatened water snake endemic to texas. *Conservation genetics*, 13: 977 – 986p. DOI: 10.1007/s10592-012-0346-x.

- RONQUIST, F.; *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61 (3): 539 – 542p. DOI: 10.1093/sysbio/sys029.
- ROSENBERG, N. A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4 (1): 137 – 138p. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x.
- ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S. 2006. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34 (12): 3299 – 3302p. DOI: 10.1093/molbev/msx248.
- ROZEN, S.; STALETSKY, H. 2000. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology*, 132: 365 – 386p. DOI: 10.1385/1-59259-192-2:365.
- SANDOM, C.; FAURBY, S.; SANDEL, B.; SVENNING, J. C. 2014. Global late Quaternary megafauna extinctions linked to humans, not climate change. *Proceedings of the Royal Society B*, 281: 20133254. DOI: 10.1098/rspb.2013.3254.
- SATOH, T. P.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; NISHIDA, M. 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC Genomics*, 17: 719. DOI: 10.1186/s12864-016-3054-y.
- SENAN, S.; KIZHAKAYIL, D.; SASIKUMAR, B.; SHEEJA, T.E. 2014. Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Notulae Scientia Biologicae*, 6 (1): 1 – 13p.
- SHAFER A. B. A.; *et al.* 2015. Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends in Ecology and Evolution*, 30 (2): 78 – 87p. DOI: 10.1016/j.tree.2014.11.009.
- SHI, W.; MIAO, X. G.; KONG, X. Y. 2014. A novel model of double replications and random loss accounts for rearrangements in the Mitogenome of *Samariscus latus* (Teleostei: Pleuronectiformes). *BMC Genomics*, 15: 352. DOI: 10.1186/1471-2164-15-352.
- SHIBATA, H.; CHIJIWA, T.; HATTORI, S. 2016. The taxonomic position and the unexpected divergence of the Habu viper, *Protobothrops* among Japanese subtropical islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101: 91 – 100p. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.04.027.
- SHIBATA, H. *et al.* 2018. The habu genome reveals accelerated evolution of venom protein genes. *Scientific Reports*, 8: 11300. DOI: 10.1038/s41598-018-28749-4.
- SILVA, K. B.; ZOGNO, M. A.; CAMILLO, A. B.; PEREIRA, R. J. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. 2015. Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. *Animal Reproduction Science*, 163: 144 – 150p. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.10.012.
- SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; LOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31 (19): 3210 – 3212p.
- SIMONOV, E.; LISACHOV, A.; ORESHKOVA, N.; KRYTOVSKY, K. 2018. The mitogenome of *Elaphe bimaculata* (Reptilia: Colubridae) has never been published: a case with the complete mitochondrial genome of *E. dione*. *ACTA Herpetologica*, 13 (2): 185 – 189p. DOI: 10.13128/Acta_Herpetol-23394.
- SIMONOV, E.; WINK, M. 2011. Cross-amplification of microsatellites loci reveals multiple paternity in Halys pitviper (*Gloydius halys*). *Acta Herpetologica*, 6 (2): 289 – 295p. DOI: 10.13128/Acta_Herpetol-9689.
- SINGCHAT, W.; *et al.* 2019. Complete mitochondrial genome of Siamese cobra (*Naja kaouthia*) determined using next-generation sequencing. *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (1): 577 – 578p. DOI: 10.1080/23802359.2018.1558123.
- SODHI, N. S.; EHRLICH, P. R. 2010. *Conservation Biology for All*. 1^a Ed. Oxford University Press. 358p.
- SONG, *et al.*, 2015. Complete mitochondrial genome of *Trimeresurus albolabris* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial Dna*, 26 (2): 291 – 292p. DOI: 10.3109/19401736.2013.825780.

- STANTON, D.W.G.; *et al.* (2019). More grist for the mill? Species delimitation in the genomic era 19 and its implications for conservation. *Conservation Genetics*, 20: 101 – 113p. DOI: 10.1007/s10592-009-01149-5.
- STÖGER, I.; SCHRÖDL, M. 2013. Mitogenomics does not resolve deep molluscan relationships (yet?). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 376 – 392p. DOI: 10.1016/j.ympev.2012.11.017.
- STOTHARD, P.; WISHART, D. S. (2005). CIRCULAR GENOME VISUALIZATION AND EXPLORATION USING CGVIEW. *Bioinformatics*, 21 (4): 537 – 539p. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti054.
- SUN, F. H. 2017. Revealing the complete mitochondrial genome of *Thermophis baileyi* Wall, 1907 (Reptilia: Colubridae) through the next-generation sequencing. *Mitochondrial Dna Part B*, 2 (2): 391 – 392p. DOI: 10.1080/23802359.2017.1347902.
- SUN, H.; *et al.* 2017. The complete mitochondrial genome of the greater green snake *Cyclophiops major* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *Mitochondrial Dna Part B*, 2 (1): 309 – 310p. DOI: 10.1080/23802359.2017.1331326.
- SUN, S.; HUI, M.; WANG, M.; SHA, Z. (2018). The complete mitochondrial genome of the alvinocaridid shrimp *Shinkaicaris leurokolos* (Decapoda, Caridea): Insight into the mitochondrial genetic basis of deep-sea hydrothermal vent adaptation in the shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part D*, 25: 42 – 52p. DOI: 10.1016/j.cbd.2017.11.002.
- SURYAMOHAN, K.; *et al.* 2020. The Indian cobra reference genome and transcriptome enables comprehensive identification of venom toxins. *Nature Genetics*, 52: 106 – 117p. DOI: 10.1038/s41588-019-0559-8.
- TAANMAN, J. W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410 (2): 103 – 123p. DOI: 10.1016/S0005-2728(98)00161-3.
- TARAILO-GRAOVAC, M.; CHEN, N. 2009. Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences. *Current protocols in bioinformatics*, 25 (1): 4 – 10p.
- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (30): 11030 – 11035p. DOI: 10.21073/pnas.0404206101.
- TEMPESTINI, A.; *et al.* 2020. Extensive gene rearrangements in the mitogenomes of congeneric species and insights on the evolutionary history of the genus *Ophryotrocha*. *BMC Genomics*, 21: 815. DOI: 10.1186/s12864-020-07176-8.
- TEMPLETON, A.R. 2011. *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva*. 1ª Ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética – SBG. 705p.
- THADEN, A.V.; *et al.* 2020. Applying genomic data in wildlife monitoring: development guidelines for genotyping degraded samples with reduced single nucleotide polymorphism panels. *Molecular Ecology Resources*, 20 (3): 662 – 680p. DOI: 10.1111/1755-0998.13136.
- THANOUE, E.; KORNILIOS, P. 2019. Next-generation sequencing yields the complete mitochondrial genome of the endangered Milos viper *Macrovipera schweizeri* (Reptilia, Viperidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 3 (2): 1250 – 1251p. DOI: 10.1080/23802359.2018.1532348.
- THE INKSCAPETEAM, 2018. *INKSCAPE*.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47 (D1): 506 – 515p. DOI: 10.1093/nar/gky/1049.
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E.; MACEY, R. 2004. Molecular phylogenetics of Squamata: the position of Snakes, Amphibaenians, and Dibamids, and the root of the Squamate tree. *Systematic Biology*, 53 (5): 735 – 757p. DOI: 10.1080/10635150490522340.
- TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. 2017. *Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações*. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira De Genética-SBG. 181p.

- UETZ, P.; FREED, P.; HOSEK, J. 2020. *The Reptile Database*. <<http://www.reptile-database.org>> Último acesso em: 12/12/2020.
- ÚJVARI, B.; *et al.* 2002. Low genetic diversity threatens imminent extinction for the Hungarian Meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*). *Biological Conservation*, 105: 127 – 130p. DOI: 10.1016/S0006-3207(01)00176-8.
- VANOOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, F. D. W.; WILLS, D.; SHIPLEY, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correction genotyping errors in microsatellites data. *Molecular Ecology Notes*, 4 (3): 535 – 538p. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
- VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F. 2016. Microsatellites markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39 (3): 312 – 328p. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- VONK, F. J.; *et al.* 2013. King cobra genome and snake venom evolution. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (51): 20651 – 20656p. DOI: 10.1073/pnas.1314702110.
- VURTURE, G.W.; *et al.* 2017. GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. *Bioinformatics*, 33 (14): 2202 – 2204p. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx153.
- WALLIS, G. P. 2019. Thirty years of conservation genetics in New Zealand: what have we learnt? *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 49 (3): 320 – 346p. DOI: 10.1080/03036758.2019.1586735.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. 1991. Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10 (4): 506 – 513p.
- WANG, D. Q.; PAN, L. L.; YANG, D. C.; DAI, L. L. 2019. Complete mitochondrial genome of the sharp-snouted pitviper *Deinagkistrodon acutus* (Reptilia, Viperidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 4 (2): 2900 – 2901p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1660593.
- WANG, G. L.; HE, S. P.; HUANG, S.; HE, M.; ZHAO, E. M. 2009. The complete mitochondrial DNA sequence and the phylogenetic position of the *Achalinus meiguensis* (Reptilia: Squamata). *Chinese Science Bulletin*, 54 (10): 1713 – 1724p. DOI: 10.1007/s11434-009-0160-0.
- WANG, H.; *et al.* 2015. Low genetic diversity and moderate inbreeding risk of an insular endemic pitviper (*Gloydus shedaoensis*): implication for conservation. *Journal of Herpetology*, 49 (2): 190 – 199p. DOI: 10.1670/13-185.
- WANG, Y.; LIU, P.; LI, H.; SHAO, C. 2019. The complete mitochondrial genome of *Opisthotropis latouchii* (Squamata: Colubridae). *Mitochondrial Dna Part B*, 4 (1): 1437 – 1438p. DOI: 10.1080/23802359.2018.1598816.
- WEST, R.; POTTER, S.; TAGGART, D.; ELDRIDGE, M.D.B. 2018. Looking back to go forward: genetics informs future management of captive and reintroduced populations of the black-footed rock-wallaby *Petrogale lateralis*. *Conservation Genetics*, 19: 235 – 247p. DOI: 10.1007/s10592-017-1030-y.
- WIED, N. 1824. Abbildungen zur Naturgeschichte Brasiliens. *Isis von Oken*, 15: 1103.
- WINTER, D.J. 2012. MMOD: a R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resource*, 12 (6): 1158 – 1160p. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x.
- WITZENBERGER, K. A.; HOCHKIRCH, A. 2011. Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetics consequences of captive breeding programs for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation*, 20: 1843 – 1861p. DOI: 10.1007/s10531-011-0074-4.
- WU, S. X. 2019. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Crotalus adamanteus* (Eastern Diamondback rattlesnake). *Mitochondrial DNA Part B*, 4 (1): 632 – 634p. DOI: 10.1080/23802359.2018.1511848.
- WU, W.; JIANG, D. C.; SUN, F. H. 2017. Next-generation sequencing yields the complete mitochondrial genome of the Shangrila hot-spring snakes (*Thermophilis shangrila*; Reptilia: Colubridae). *Mitochondrial DNA Part B*, 2 (1): 327 – 328p. DOI: 10.1080/23802359.2017.1331330.

- WÜSTER, W.; DUARTE, M.R.; SALOMAO, M. G. 2005. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithopy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. *Journal of Zoology*, 266 (1): 1 – 10p. DOI: 10.1017/S0952836904006247.
- XU, C.; *et al.* 2016. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Elaphe davidi* (Squamata: Colubridae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (4): 2383 – 2384p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1028041.
- XU, C.; *et al.* 2016. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Gloydus saxatilis* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (4): 2361 – 2362p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1025264.
- XU, C.; ZHAO, S.; HAN, X. 2016. Sequence and organization of the complete mitochondrial genome of *Hebius vibakari ruthveni* from China. *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (4): 2661 – 2662p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1043535.
- XU, C.; ZHAO, S.; LI, C.; DOU, H. 2016. The complete mitochondrial genome of *Gloydus intermedius* (Squamata: Viperidae: Crotalinae) from China. *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (4): 2373 – 2374p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1028036.
- XU, K.; YU, X. 2017. The complete mitochondrial genome of the copperhead (*Agkistrodon contortrix*) and phylogenetic analyses of Crotalinae (Serpentes; Colubroidea; Viperidae). *Conservation Genetics Resources*, 9: 607 – 611p. DOI: 10.1007/s12686-017-0736-y.
- YAN, J.; LI, H.; ZHOU, K. 2009. Evolution of the mitochondrial genome in snakes: gene rearrangements and phylogenetic relationships. *BMC Genomics*, 9: 569. DOI: 10.1186/1471-2164-9-569.
- YAN, L.; GENG, Z. Z.; YAN, P.; WU, X. B. 2016. The complete mitochondrial genome of *Elaphe bimaculata* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (2): 1285 – 1286p. DOI: 10.3109/19401736.2014.945558.
- YAN-BO, S. 2017. FasParser: a package for manipulating sequence data. *Zoological Research*, 38 (2): 110 – 112p. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.017.
- YAO, L. Z.; GONG, Y. A.; TANG, X. S. 2020. Complete mitochondrial genome of the maclelland's coral snake *Sinomicrurus maclellandi* (Reinhardt, 1844) (Serpentes: Elapidae). *Mitochondrial Dna Part B*, 5 (3): 2582 – 2584p. DOI: 10.1080/23802359.2020.1781571
- YEOMAN, 2014. *Why the Passenger Pigeons went extinct: And whether it can, and should, be brought back to life a century after it disappeared*. <<https://www.audubon.org/magazine/may-june-2014/why-passenger-pigeons-went-extinct>>. Último acesso em: 12/01/2021.
- YI, C. H.; *et al.* 2019. Complete mitochondrial genome of the *Hydrophis melanocephalus* slender-necked sea snake (Squamata, Elapidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 5 (2): 1406 – 1407p. DOI: 10.1080/23802359.2020.1735277.
- YI, C. H.; *et al.* 2019. Complete mitochondrial genome of the Ijima's sea snake (*Emydocephalus ijimae*) (Squamata, Elapidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 4 (2): 2658 – 2659p. DOI: 10.1080/23802359.2019.1641438.
- ZAHER, H.; *et al.* 2019. Large-scale molecular phylogeny, morphology, divergence-time estimation, and the fossil record of advanced caenophidian snakes (Squamata: Serpentes). *Plos One*, 14 (5): e0217959. DOI: 10.1371/journal.pone.0217959.
- ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, R. S.; FURTADO, M. F. D. 2008. Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. *South American Journal of Herpetology*, 3 (1): 43 – 50p. DOI: 10.2994/1808-9798(2008)3[43:OCITVO]2.0.CO;2.
- ZHANG, B.; HUANG, X.; ZHANG, L.; HAN, D. 2015. Mitochondrial genome of *Protobothrops xiangchengsis* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 26 (4): 638 – 639p. DOI: 10.3109/19401736.2013.836513.

- ZHANG, L.; HUANG, X.; HAN, D.; XUE, C.; ZHANG, B. 2015. Mitochondrial genome of *Protobothrops cornutus* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 26 (2): 278 – 279p. DOI: 10.3109/19401736.2013.825774.
- ZHANG, L.; HUANG, X.; LI, Z.; HU, H.; ZHANG, B. 2013. Mitochondrial genome of *Protobothrops mucrosquamatus* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA*, 24 (5): 495 – 497p. DOI: 10.3109/19401736.2013.770502.
- ZHANG, Y.; *et al.* 2017. Complete mitochondrial genome of the Rufous burrowing snake, *Achalinus rufescens* (Reptilia: Xenodermatidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 2 (2): 419 – 420p. DOI: 10.1080/23802359.2017.1347842.
- ZHAO, D.; LIU, H.; ZHAO, W. G.; LIU, P. 2016. The complete mitochondrial DNA sequence and the phylogenetic position of *Rhabdophis tigrinus* (Reptilia: Squamata). *Mitochondrial DNA Part B*, 1 (1): 216 – 217p. DOI: 10.1080/23802359.2016.1155092.
- ZHENG, Y., WIENS, J. J. 2016. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94 (Pt B): 537 – 547p. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.10.009.
- ZHOU, B.; DING, C.; DUAN, Y.; HUI, G. 2016. The complete mitochondrial genome sequence of *Ptyas mucosus*. *Mitochondrial DNA Part B*, 1 (1): 193 – 194p. DOI: 10.1080/23802359.2015.1137848.
- ZHOU, X.; LIN, Q.; FANG, W.; CHEN, X. 2014. The complete mitochondrial genomes of sixteen Ardeid birds revealing the evolutionary process of the gene rearrangements. *BMC Genomics*, 15: 573. DOI: 10.1189/1471-2164-15-573.
- ZHU, F.; *et al.* 2016. Complete mitochondrial genome of *Sinovipera sichuanensis* (Reptilia: Squamata: Viperidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27 (5): 3666 – 3667p. DOI: 10.3109/19401736.2015.1079846.
- ZHU, J. C.; *et al.* 2018. The first two mitochondrial genomes of the family Aphelinidae with novel gene orders and phylogenetic implications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118: 386 – 396p. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.087.
- ZONG, H.; *et al.* 2020. The complete mitochondrial genome of *Amphiesma optatum*. *Mitochondrial DNA Part B*, 5 (1): 812 – 813p. DOI: 10.1080/23802359.2020.1715873.

APÊNDICE 1

Lista dos indivíduos analisados das populações *ex situ* e *in situ* de *Bothrops insularis*. Os indivíduos cativos são mantidos no Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Os sufixos F e FF referem, respectivamente, a indivíduos nascidos em 2010 e indivíduos nascidos em 2013/2014. Os prefixos ID e KB referem, respectivamente, a indivíduos do plantel e indivíduos da ilha coletados por nossa parceira Karina Banci.

Área de amostragem 1 (Fig. 2A): Laboratório de Ecologia e Evolução – Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Coordenadas geográficas: -23.3351; -46.4315.

Machos: ID0002, ID0004, ID0016, ID0017, ID0018, ID002F, ID004F, ID005F, ID006F, ID0009F, ID011F, ID013F, ID021F, ID024F, ID01FF, ID11FF, ID12FF, ID13FF, ID14FF, ID19FF, ID20FF, ID23FF, ID26FF, ID27FF.

Fêmeas: ID0003, ID0005, ID0006, ID0007, ID0008, ID0009, ID0010, ID0011, ID0012, ID0013, ID001F, ID014F, ID015F, ID017F, ID022F, ID02FF, ID03FF, ID08FF, ID09FF, ID16FF, ID22FF.

Sexo inderteminado: ID04FF, ID05FF, ID06FF, ID21FF.

Área de amostragem 2 (Fig 2A-B): Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil.

Coordenadas geográficas do ponto centróide: -24.47996111; -46.67593611.

Machos: KB0001, KB0011, KB0012, KB0020, KB0021, KB0029, KB0030.

Fêmeas: KB0002, KB0003, KB0013, KB0014, KB0028.

Área de amostragem 3 (Fig 2A-B): Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil.

Coordenadas geográficas do ponto centróide: -24.48476944; -46.67585000.

Machos: KB0007, KB0018, KB0019, KB0022, KB0024, KB0026, KB0031.

Fêmeas: KB0004, KB0005, KB0006, KB0008, KB0009, KB0010, KB0015, KB0016, KB0017, KB0023, KB0025, KB0027.

APÊNDICE 2

Tabela Suplementar 1 – Lista dos indivíduos usados para a reconstrução das análises filogenéticas e análises comparativas dos mitogenomas de Serpentes. Número de acesso se refere ao número de acesso no *GenBank*.

Infraorder	Hiperfamilia	Familia	Gênero	Espécie	Número de acesso	Tamanho (bp)	Referência	
Alethinophidia	Caenophidia	Acrochordidae	<i>Achochordus</i>	<i>Granulatus</i>	NC007400	17604	Dong & Kumazawa, 2005.	
			Colubridae	<i>Elaphe</i>	<i>Anômala</i>	NC027001	17164	Liu & Zhao, 2016.
				<i>Bimaculata</i>	NC024743	17183	Yan et al., 2016.	
				<i>Carinata</i>	KU180459	17154	Ding et al., 2016.	
				<i>Davidi</i>	NC025643	17117	Xu et al., 2016.	
				<i>Dione</i>	NC041068	17172	Simonov et al., 2018.	
				<i>Quatuorlineata</i>	MK334307	17183	Jablonski et al., 2019.	
				<i>Sauromates</i>	MK070315	17187	Jablonski et al., 2019.	
				<i>Schrenckii</i>	NC027605	17165	Liu & Zhao, 2016.	
				<i>Taeniura</i>	NC025275	17183	Li et al., 2016.	
				<i>Euprepiophis</i>	<i>Perlacea</i>	NC024546	17160	Wan et al., Unpublished.
				<i>Lycodon</i>	<i>Flavozonatus</i>	NC028730	17172	Ding et al., 2016.
					<i>Rufozonatus</i>	NC024559	17188	Qian et al., 2018.
					<i>Ruhstrati</i>	NC046046	17168	Gong et al., 2019.
					<i>Semicarinatus</i>	NC001945	17191	Kumazawa et al., 1998.
		<i>Oocatochus</i>	<i>Rufodorsatus</i>		NC022146	17159	Li et al., 2014.	
		<i>Oreocryptophis</i>	<i>Porphyraceus</i>		NC012770	17167	Lin et al., Unpublished.	
		<i>Orientocoluber</i>	<i>Spinalis</i>		NC049067	17196	Park et al., Unpublished.	
		<i>Pantherophis</i>	<i>Guttatus</i>		AM236349	16445	Douglas et al., 2006.	
			<i>Slowinskii</i>		NC009769	17189	Jiang et al., 2007.	
			<i>Pituophis</i>		<i>Pituophis catenifer sayi</i>	KU833245	17193	Lele et al., 2016.
			<i>Ptyas</i>	<i>Dhumnades</i>	NC028049	17164	Li et al., Unpublished	
		<i>Major</i>		NC028048	17217	Sun et al., 2017.		
		<i>Mucosa</i>		NC030041	17151	Zhou et al., 2016.		
		<i>Stichophanes</i>		<i>Ningshaanensis</i>	NC026083	17292	Wang & Zhu, Unpublished.	
		Natricidae		<i>Hebius</i>	<i>Optatum</i>	MN427890	17259	Zong et al., 2020.
				<i>vibakari ruthveni</i>	KP684155	17259	Xu et al., 2016.	
			<i>Nerodia</i>	<i>Sipedon</i>	NC015793	17706	Huff et al., Unpublished.	
			<i>Opisthotropis</i>	<i>Latouchii</i>	NC046823	17051	Wang et al., 2019.	
			<i>Rhabdophis</i>	<i>Tigrinus</i>	NC030210	17415	Zhao et al., 2016.	
		Sibynophiidae		<i>Sibynophis</i>	<i>Chinensis</i>	NC022430	17163	Oh et al., 2015.
				<i>Collaris</i>	NC016424	17163	Jang & Hwang, 2011.	

Continuação Tabela Suplementar 1 – Lista dos indivíduos usados para a reconstrução das análises filogenéticas e análises comparativas dos mitogenomas de Serpentes. Número de acesso se refere ao número de acesso no *GenBank*.

Infraorder	Hiperfamília	Família	Gênero	Espécie	Número de acesso	Tamanho (bp)	Referência
		Dipsadidae	<i>Hypsiglena</i>	<i>Affinis</i>	MT561499	17190	Myers & Mulcahy, 2020.
				<i>Catalinae</i>	KJ486459	17208	Mulcahy et al., 2014.
				<i>chlorophaea chlorophaea</i>	NC013977	17209	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>chlorophaea deserticola</i>	NC013989	17209	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>jani jani</i>	MT561500	17205	Myers & Mulcahy, 2020.
				<i>jani texana 1</i>	NC013975	17203	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>jani texana 2</i>	MT561497	17235	Myers & Mulcahy, 2020.
				<i>ochrorhyncha klauberi</i>	NC013984	17205	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>ochrorhyncha nuchalata</i>	NC013983	17207	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>ochrorhyncha ochrorhyncha</i>	NC013980	17205	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>slevini</i>	NC013987	17197	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>sp. (1)</i>	MT561495	17200	Myers & Mulcahy, 2020.
				<i>sp. (2)</i>	NC013982	17205	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>torquata</i>	NC013992	17203	Mulcahy & Macey, 2009.
				<i>unaocularis</i>	NC024164	17211	Mulcahy et al., 2014.
			<i>Imantodes</i>	<i>cenchoa</i>	NC013988	22144	Mulcahy & Macey, 2009.
			<i>Leptodeira</i>	<i>polysticta</i>	NC013990	17506	Mulcahy & Macey, 2009.
			<i>Pseudoleptodeira</i>	<i>latifasciata</i>	NC013981	18329	Mulcahy & Macey, 2009.
			<i>Sibon</i>	<i>nebulatus</i>	NC013985	22887	Mulcahy & Macey, 2009.
			<i>Thermophis</i>	<i>baileyi</i>	NC035713	17355	Sun, 2017.
				<i>shangrila</i>	NC035058	17407	Wu et al., 2017.
				<i>zhaoermii</i>	NC012816	17322	He et al., 2010.
	Elapidae		<i>Bungarus</i>	<i>fasciatus</i>	NC011393	17234	Chen & Zhao, 2009.
				<i>multicinctus</i>	NC011392	17144	Chen & Zhao, 2009.
			<i>Emydocephalus</i>	<i>ijimae</i>	MT547176	18259	Yi et al., 2019.
			<i>Hydrophis</i>	<i>curtus</i>	NC046794	17702	Qiu et al., 2019.
				<i>cyanocinctus</i>	NC046795	17750	Qiu et al., 2019.
				<i>melanocephalus</i>	MK775532	17182	Yi et al., 2019.
				<i>platurus</i>	MK775530	18101	Kim et al., 2020.
			<i>Micrurus</i>	<i>fulvius</i>	NC013481	17506	Castoe et al., 2009.
			<i>Naja</i>	<i>Atra</i>	NC011389	17216	Chen & Zhao, 2009.
				<i>kaouthia</i>	LC431744	17203	Singchat et al., 2019.
				<i>naja</i>	NC010225	17213	Yan et al., 2008.
			<i>Ophiophagus</i>	<i>hannah</i>	NC011394	17267	Chen & Lai, 2010.
			<i>Laticauda</i>	<i>colubrina</i>	NC036054	17450	Kim et al., 2018.

Continuação da Tabela Suplementar 1 – Lista dos indivíduos usados para a reconstrução das análises filogenéticas e análises comparativas dos mitogenomas de Serpentes. Número de acesso se refere ao número de acesso no *GenBank*.

Infraorder	Hiperfamília	Família	Gênero	Espécie	Número de acesso	Tamanho (bp)	Referência
				<i>laticaudata</i>	NC036053	17209	Kim et al., 2018.
				<i>semifasciata</i>	NC036055	17170	Kim et al., 2018.
			<i>Sinomicrurus</i>	<i>macclellandi</i>	MT547176	17120	Yao et al., 2020.
		Homalopsidae	<i>Hypsigocopus</i>	<i>plumbea</i>	NC010200	17397	Yan et al., 2008.
			<i>Emydocephalus</i>	<i>ijimae</i>	MT547176	18259	Yi et al., 2019.
		Viperidae	<i>Azemiops</i>	<i>Feae</i>	NC030781	17383	Geng & Yan, Unpublished.
			<i>Agkistrodon</i>	<i>contortrix</i>	NC035638	16269	Xu & Yu, 2017.
				<i>piscivorus</i>	NC009768	17213	Jiang et al., 2007.
			<i>Bothrops</i>	<i>diporus</i>	NC039649	17642	Kleiz et al., Unpublished.
				<i>pubescens</i>	NC039648	17694	Kleiz et al., Unpublished.
				<i>jararaca</i>	NC030760	17526	Almeida et al., 2016.
			<i>Crotalus</i>	<i>adamanteus</i>	NC041524	17242	Wu, 2019.
				<i>horridus</i>	NC014400	17260	Hall et al., 2013.
			<i>Deinagkistrodon</i>	<i>acutus</i>	NC010223	17548	Yan et al., 2008.
			<i>Gloydus</i>	<i>brevicaudus</i>	NC011390	17227	Chen & Zhao, 2009.
				<i>intermedius</i>	NC025560	17226	Xu et al., 2016.
				<i>saxatilis</i>	NC025666	17218	Xu et al., 2016.
				<i>shedaeoensis</i>	NC029424	17222	Liu et al., 2016.
				<i>strauchii</i>	NC036234	17224	Yang et al., Unpublished.
				<i>ussuriensis</i>	NC026553	17208	Han et al., 2016.
			<i>Ovophis</i>	<i>Okinavensis</i>	NC007397	17388	Dong & Kumazawa, 2005.
			<i>Protobothrops</i>	<i>Cornutus</i>	NC022695	17219	Zhang et al., 2015.
				<i>Dabieshanensis</i>	NC022473	17193	Huang et al., 2014.
				<i>Flavoviridis</i>	NC030181	17232	Shibata et al., 2016.
				<i>Himalayanus</i>	NC029165	17389	Huang & Zang, Unpublished.
				<i>Jerdonii</i>	NC021402	17239	Huang et al., 2013.
				<i>Kaulbacki</i>	NC029166	17237	Huang & Zang, Unpublished.
				<i>Mangshanensis</i>	NC026052	17230	Huang et al., 2014.
				<i>Maolanensis</i>	NC026051	17228	Huang et al., 2014.
				<i>Mucrosquamatus</i>	NC021412	17234	Zhang et al., 2013.
				<i>Mucrosquamatus</i>	KT447436	17223	Chen et al., Unpublished.
				<i>Tokarensis</i>	NC030182	17233	Shibata et al., 2016.
				<i>Xiangchengensis</i>	KF460436	17240	Zhang et al., 2015.
			<i>Trimeresurus</i>	<i>Albolabris</i>	NC022820	17220	Song et al., 2015.
				<i>Erythrurus</i>	NC045531	17225	Vaishnavi et al., Unpublished.

Continuação da Tabela Suplementar 1 – Lista dos indivíduos usados para a reconstrução das análises filogenéticas e análises comparativas dos mitogenomas de Serpentes. Número de acesso se refere ao número de acesso no *GenBank*.

Infraorder	Hiperfamilia	Familia	Gênero	Espécie	Número de acesso	Tamanho (bp)	Referência
				<i>Sichuanensis</i>	NC029494	17225	Zhu et al., 2016.
				<i>stejnegeri stejneri</i>	NC012146	17239	Lin et al., Unpublished.
			<i>Causus</i>	<i>defilippii</i>	NC013479	17342	Castoe et al., 2009.
			<i>Daboia</i>	<i>Russellii</i>	NC011391	17246	Chen & Zhao, 2009.
			<i>Macrovipera</i>	<i>Schweizeri</i>	NC044966	17152	Thanou & Kornilios, 2019.
			<i>Vipera</i>	<i>Berus</i>	NC036956	16370	Gao et al., 2018.
		Xenodermidae	<i>Achalinus</i>	<i>Meiguensis</i>	NC011576	17239	Wang et al., 2009.
				<i>Rufescens</i>	NC032085	17339	Zhang et al., 2017.
				<i>Spinalis</i>	NC032084	17165	Peng et al., 2017.
	Henophidia	Boidae	<i>Boa</i>	<i>Constrictor</i>	NC007398	18905	Dong & Kumazawa, 2005.
				<i>constrictor imperator</i>	AM236348	16607	Douglas et al., 2006.
			<i>Eunectes</i>	<i>Notaeus</i>	AM236347	17970	Douglas et al., 2006.
			<i>Eryx</i>	<i>Tataricus</i>	-	17537	Cai et al., 2020.
		Pythonidae	<i>Malayopython</i>	<i>Reticulatus</i>	NC042397	17641	He, Unpublished.
			<i>Python</i>	<i>Bivittatus</i>	NC021479	17617	Liu et al., Unpublished.
			<i>Python</i>	<i>molurus molurus</i>	NC015812	17258	Dubey et al., 2012.
			<i>Python</i>	<i>Regius</i>	NC007399	17245	Dong & Kumazawa, 2005.
		Xenopeltidae	<i>Xenopeltis</i>	<i>Unicolor</i>	NC007402	18872	Dong & Kumazawa, 2005.
		Cylindrophiiidae	<i>Cylindrophis</i>	<i>Ruffus</i>	NC007401	17499	Dong & Kumazawa, 2005.
		Aniliidae	<i>Anilius</i>	<i>Scytale</i>	NC014343	17713	Castoe et al., 2009.
		Tropidophiidae	<i>Tropidophis</i>	<i>Haetianus</i>	NC012573	17138	Castoe et al., 2009.
Scolecophidia	Scolecophidia	Gerrhopilidae	<i>Gerrhopilus</i>	<i>Mirus</i>	AM236345	14662	Douglas et al., 2006.
		Leptotyphlopidae	<i>Rena</i>	<i>Humilis</i>	NC005961	16218	Kumazawa, 2004.
		Typhlopidae	<i>Amerotyphlops</i>	<i>Reticulatus</i>	NC010971	16681	Castoe et al., 2008.
			<i>Anilios</i>	<i>Australis</i>	AM236346	14356	Douglas et al., 2006.
			<i>Indotyphlops</i>	<i>Braminus</i>	NC010196	16397	Yan et al., 2008.
			<i>Xerotyphlops</i>	<i>Vermicularis</i>	NC044967	16568	Kornilios et al., 2019.

APÊNDICE 3

Tabela Suplementar 2 – Partições e modelos seus modelos evolutivos utilizados para reconstrução filogenética empregando o método de máxima verossimilhança a partir do IqTree 1.6.12.

Modelo	Partição
GTR + F + I + G4	rRNA 12-S
TVM + F + I + G4	COX1 P3, COX3 P3
TIM + F + I + G4	ND4-L P3, ND4 P3, ND3 P3, ND5 P3, ATP6 P3, CYTB P3, COX2 P3
GTR + F + I + G4	ND6 P2
GTR + F + I + G4	COX1 P1, COX3 P1, COX2 P1
TVM + F + G4	ND1 P3
TVM + F + I + G4	ND3 P2, ATP6 P2, COX2 P2, CYTB P2, ND1 P2, ND4 P2, ND2 P2, ND4-L P2
GTR + F + I + G4	ND4-L P1, ND4 P1, ND3 P1, CYTB P1
GTR + F + I + G4	ND5 P2
TIM + F + G4	ND2 P3
GTR + F + I + G4	ND2 P1, ND5 P1, ATP6 P1
GTR + F + I + G4	COX3 P2, COX1 P2
GTR + F + I + G4	ATP8 P2, rRNA 16-S
TVM + F + I + G4	ND6 P3
TN + F + I + G4	ATP8 P1
HKY + F + I + G4	ATP8 P3
GTR + F + I + G4	ND6 P1

APÊNDICE 4

Tabela Suplementar 3 – Partições e modelos evolutivos usados na reconstrução filogenética empregando o método de inferência Bayesiana a partir do MrBayes 3.1.2.

Modelo	Partição
nst = 6 rates = invgamma	rRNA 12-S
nst = 6 rates = invgamma	COX1 P3, COX3 P3
nst = 6 rates = invgamma	ND4-L P3, ND4 P3, ND3 P3, ND5 P3, ATP6 P3, CYTB P3, COX2 P3
nst = 6 rates = invgamma	ND6 P2
nst = 6 rates = invgamma	COX1 P1, COX3 P1, COX2 P1
nst = 6 rates = gamma	ND1 P3
nst = 6 rates = invgamma	ND3 P2, ATP6 P2, COX2 P2, CYTB P2, ND1 P2, ND4 P2, ND2 P2, ND4-L P2
nst = 6 rates = invgamma	ND4-L P1, ND4 P1, ND3 P1, CYTB P1
nst = 6 rates = invgamma	ND5 P2
nst = 6 rates = gamma	ND2 P3
nst = 6 rates = invgamma	ND2 P1, ND5 P1, ATP6 P1
nst = 6 rates = invgamma	COX3 P2, COX1 P2
nst = 6 rates = invgamma	ATP8 P2, rRNA 16-S
nst = 6 rates = invgamma	ND6 P3
nst = 6 rates = invgamma	ATP8 P1
nst = 2 rates = invgamma	ATP8 P3
nst = 6 rates = invgamma	ND6 P1

APÊNDICE 5

Script usado para realizar as análises descritas acerca das análises populacionais, por meio do programa R V.3.5.1 (RCORETEAM, 2018), a partir dos seguintes pacotes: POPPR V.2.8.1 (KAMVAR et al., 2014; KAMVAR et al., 2015); ADEGENET V.2.1.1 (JOMBART, 2008); PEGAS V.0.11 (PARADIS, 2010); HIERFSTAT V.0.44-22 (GOUDET, 2005); MMOD (WINTER, 2012); e GGLOT2 (WICKHAM, 2016).

```
#STEPONE – INSTALLING AND ACCESSING PACKAGES.

#Installing packages
install.packages ("poppr")
install.packages ("adegenet")
install.packages ("pegas")
install.packages ("hierfstat")
install.packages ("ggplot2")
install.packages ("mmod")

#Accessing packages
library (poppr)
library (adegenet)
library (pegas)
library (hierfstat)
library (ggplot2)
library (mmod)

#STEPTWO – ACCESSING THE GENETIC DATA TO OBTAIN A GENING OBJECT.

Binsularis <- read.genepop ("B_insularis_1pop.gen", ncode = 3, quiet = FALSE)

#STEP THREE – DATA QUALITY, LINKAGE DISEQUILIBRIUM AND HARDY-WEIBERG
EQUILIBRIUM TESTS.

## Data quality test

Bins_clean <- poppr::missingno (Binsularis, type = "genotype", cutoff = 0.3)
Bins_clean2 <- poppr::missingno (Bins_clean, type = "loci", cutoff = 0.3)
B_insularis <- Bins_clean2
```

```

##Testing linkage disequilibrium per pair

set.seed(999)
pairia.metapop <- pair.ia (B_insularis, sample = 1000)
set.seed(999)
pairia.pop <- seppop (B_insularis) %>% lapply (pair.ia, sample = 1000)

##Estimating Hardy-Weinberg Equilibrium per population

set.seed(999)
nanhwe.pop <- seppop (B_insularis) %>% lapply (hw.test, B = 1000)
nanhwe.mat <- sapply (nanhwe.pop, "[", i = TRUE, j = 4)

#STEP FOUR – GENETIC DIVERSITY AND INBREEDING COEFFICIENT PER KINSHIP
INDEXES

B_insularis <- read.genepop ("B_insularis_clean_comoffspring.gen", ncode=3, quiet = FALSE)

#Accessing genetic diversity indexes

populations <- seppop (B_insularis)
set.seed (999)
sapply (populations,locus_table)
set.seed (999)
private_alleles (B_insularis)
set.seed (999)
allelic.richness (B_insularis)
set.seed (999)
summary (B_insularis)

#Inbreeding coefficient per kinship index

set.seed (999)
inbred_coef <- sapply (populations, inbreeding, res.type = "estimate")
Fis_Bar <- sapply (inbred_coef, mean)
Fis_Bar
set.seed(999)
boot.ppfis (dat = B_insularis, nboot =1000, quant = c (0.0025,0.998), diploid = TRUE, dig=4)

#STEP FIVE – POPULATIONAL DIFFERENTIATION INDEXES

B_insularis_off <- read.genepop ("testedapc.gen", ncode = 3, quiet = FALSE)

#Accessing the population differentiation indexes

set.seed (999)
testefst <- as.loci (B_insularis_off)
fsttab <- Fst (testefst)
fsttab
fstat (B_insularis_off)
set.seed (999)
pop_stru <- diff_stats (B_insularis_off)

#Estimating confidence intervals

set.seed (999)
bs_reps <- chao_bootstrap (B_insularis_off, nreps = 999)
summarise_bootstrap (bs_reps, D_jost)
summarise_bootstrap (bs_reps, Gst_Hedrick)
summarise_bootstrap (bs_reps, Gst_Nei)

```

```

#STEP SIX – Analysis of Molecular Variance

B_insularis_off <- read.genepop ("testedapc.gen", ncode = 3, quiet = FALSE)

#Gathering the hierarchic information

strata <- read.table ("B_insularis_strutpop.txt", header = TRUE, sep = "\t")
strata (B_insularis_off) <- other (B_insularis_off) <- strata [-1]

#AMOVA

set.seed(999)
amova.result <- poppr.amova (B_insularis_off, ~Pop, filter = FALSE)
set.seed(999)
amovasinificance <- randtest (amova.result, nrepet = 999)
amovasinificance

#STEP SEVEN – DISCRIMINANT ANALYSIS OF PRINCIPAL COMPONENTS

B_insularis_off <- read.genepop ("testedapc.gen", ncode=3, quiet = FALSE)

#Inferring the number of genetic clusters

set.seed(999)
grp <- find.clusters (B_insularis_off, max.n.clust = 10)
30 #number of PCs
5 #number of clusters

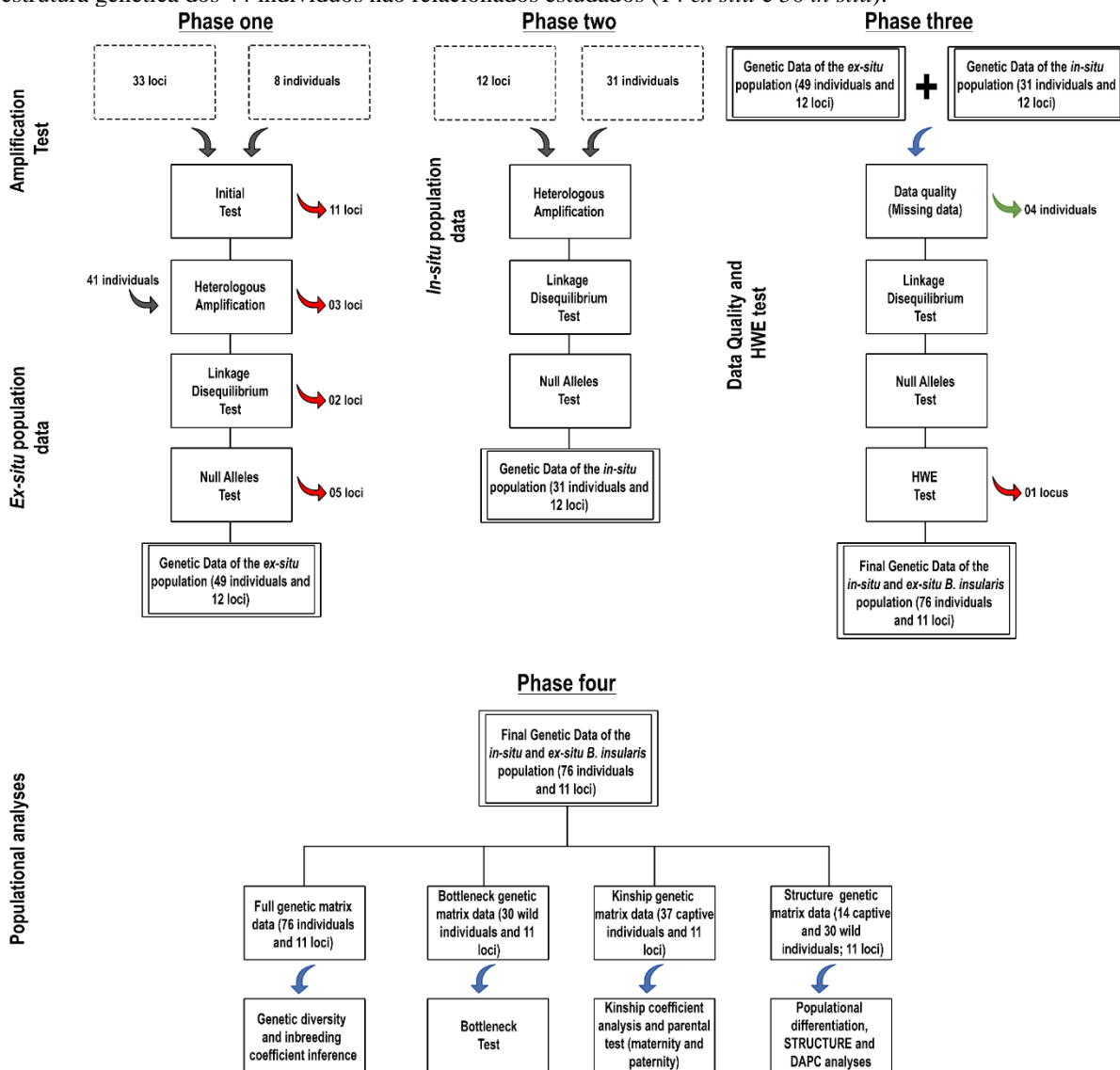
#DAPC analysis

set.seed (999)
dapc1 <- dapc (B_insularis_off, grp$grp)
25 #number of PCs
3 #number of discriminants
set.seed (999)
optim.a.score (dapc1)
set.seed (999)
dapc2 <- dapc (B_insularis_off, grp$grp, n.pca = 6)
3 #number of discriminants
myCol <- c ("darkblue", "darkgrey", "darkgreen", "orange", "red")
compoplot (dapc2, col.pal = myCol, border = "black", show.lab = TRUE, lab = rownames
("B_insularis_off"), txt.leg = paste ("Cluster", 1:5), posi = "topleft", cleg=.7)

```

APÊNDICE 6

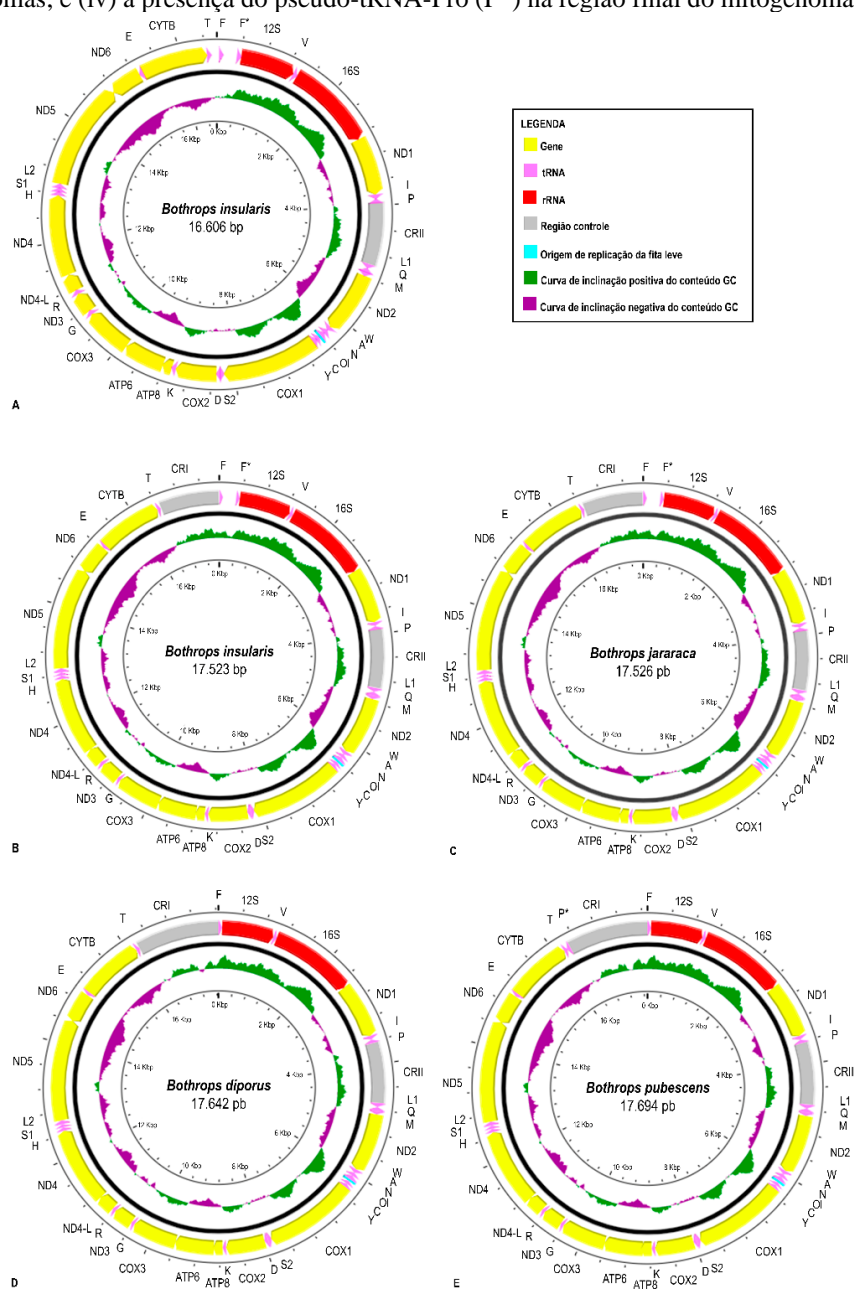
Figura Suplementar 1 – Esquema simplificado da metodologia e dos resultados obtidos acerca das análises populacionais deste estudo. A fase 1 engloba os testes de amplificação heterolôga dos microssatélites desenvolvidos para as espécies do grupo *B. neuwiedi* e os resultados de diversidade genética obtidos para a população *ex situ*. A fase dois englobe à amplificação dos 12 microssatélites, significativos na fase 1, e os resultados de diversidade genética obtidos para a população *in situ*. A fase três se baseia em testes que visam minimizar o erro das fases de análises subsequentes, e foram realizadas no conjunto de dados geral (populações *ex situ* e *in situ*). Por fim, a fase quatro é composta pelas análises populacionais realizadas: (i) inferência da diversidade genética e valores dos coeficientes de endocruzamento; (ii) análise de efeito gargalo na população *in situ*; (iii) inferência do coeficiente de parentesco e testes de parentesco da população *ex situ*; e (iv) análise da estrutura genética dos 44 indivíduos não relacionados estudados (14 *ex situ* e 30 *in situ*).



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

APÊNDICE 7

Figura Suplementar 2 – Mitogenomas de quatro espécies do gênero *Bothrops*: *B. insularis* (A: montagem *de novo*/ 16.606 pb; B: montagem a partir do mitogenoma de referência/ 17.523 pb) descrita no presente estudo. *B. jararaca* (C/ 17.526 pb), *B. diporus* (D/ 17.642 pb) e *B. pubescens* (E/ 17.694 pb) descritas em trabalhos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2016; KLEIZ *et al.*, unpublished). Os nomes de todos os genes, rRNAs e tRNAs estão abreviados. Retângulos vermelho representam os RNA ribossômicos (rRNA). Retângulos amarelo representam os genes codificantes de proteínas respiratórias. Retângulos rosa representam os RNA de transferência (tRNA). Retângulos cinza representam as regiões controle (RC). Retângulos azul-claro representam a região de origem de replicação da fita leve (O_L). Note: (i) todas as regiões genéticas supracitadas possuem seu direcionamento indicado pela ponta de seta localizada no final de cada bloco; (ii) a existência de uma única região controle no mitogenoma de *B. insularis* obtido por meio do método de novo (A) e a existência de duas regiões controle no mitogenoma de *B. insularis* obtido por meio de um mitogenoma de referência (B); (iii) a presença do pseudo-tRNA-Phe (F*) na região inicial do mitogenoma de *B. insularis* e *B. jararaca*; (iv) a presença de um GAP entre os dois primeiros tRNAs (F e F*) do mitogenoma *B. insularis* e *B. jararaca* correspondente à região não-codificante recuperada nesses mitogenomas; e (v) a presença do pseudo-tRNA-Pro (P*) na região final do mitogenoma de *B. pubescens*.



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

APÊNDICE 8

Tabela Suplementar 4 – Transferência de anotação para o mitogenoma obtido por meio da montagem de novo.

Referência (KU_194299)	Anotações	Anotações transferidas (%)	Exclusão por sobreposição (%)	Exclusão por identidade (%)	Exclusão por ausência de alinhamento (%)
Gene	13	13 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Características diversas	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Origem de replicação da fita L	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
tRNAs	22	22 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
rRNAs	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	55	55 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

APÊNDICE 9

Tabela Suplementar 5 – Transferência de anotação para o mitogenoma obtido por meio da montagem a partir de um genoma de referência.

Referência (NC_030760)	Anotações	Anotações transferidas (%)	Exclusão por sobreposição (%)	Exclusão por identidade (%)	Exclusão por ausência de alinhamento (%)
Gene	13	13 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Características diversas	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Origem de replicação da fita L	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
tRNAs	22	22 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
rRNAs	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	55	55 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

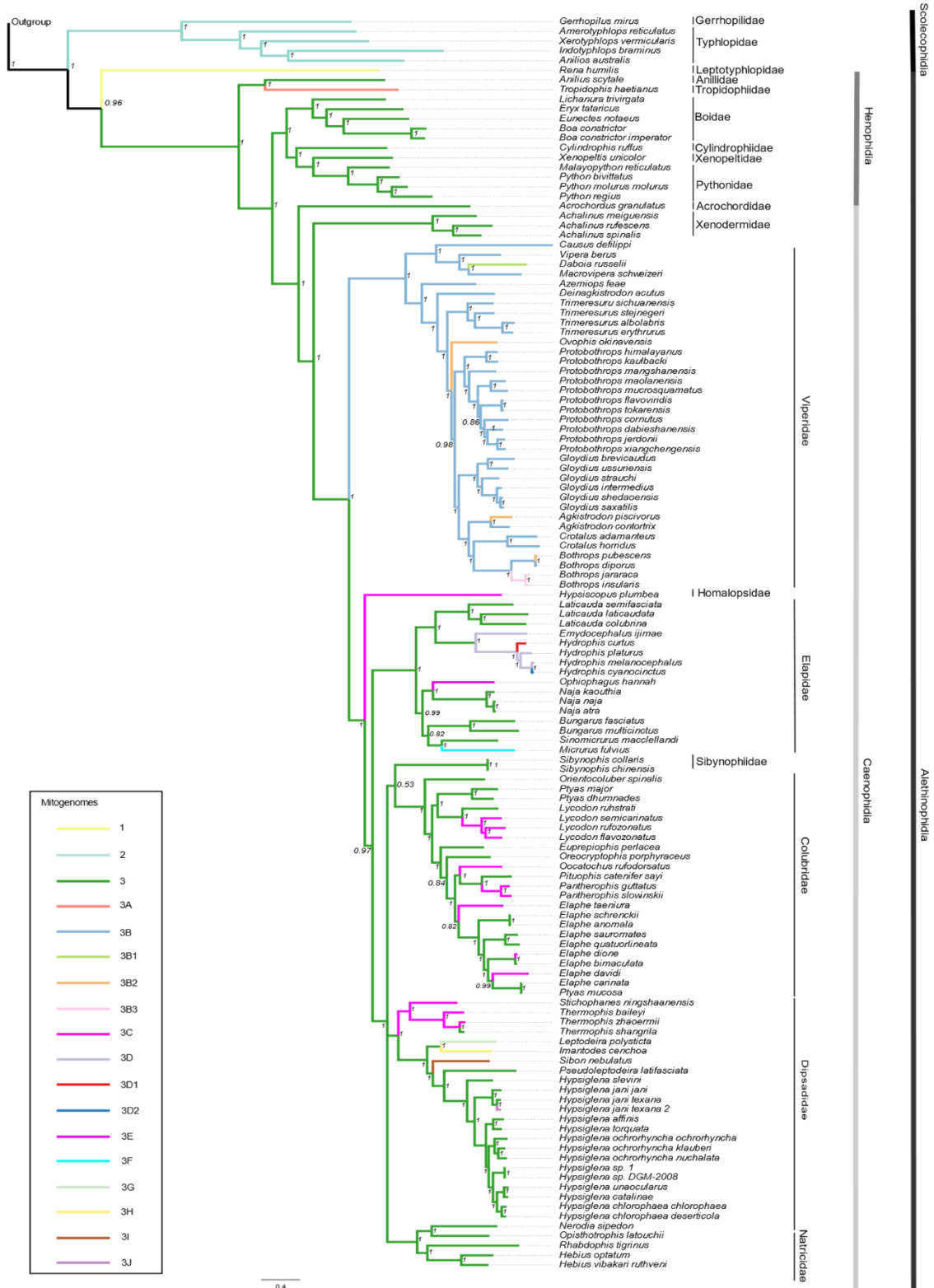
APÊNDICE 10

Tabela Suplementar 6 - Regiões não anotadas encontradas no mitogenomas de Serpentes.

Espécies	Posição	Mapeado à referência	UNIPROT	Blast			
				Nr/Nt	TSA	RefSeq – RNA	HTGS
<i>Crotalus horridus</i>	12389 – 12504	-	ND4	ND4	ND4	-	-
<i>Daboia russelii</i>	3544 – 3614	-	-	tRNA-Pro (P) + Região controle II	-	-	-
<i>Emydocephalus ijimae</i>	6324 – 6368	tRNA-Asn (N) (31.1%)	-	-	-	-	-
<i>Hebius optatum</i>	4304 – 4688	-	-	Região controle II	-	-	-
<i>Hydrophis curtus</i>	2518 – 2550	-	UDEN Ringtype E3	rRNA – 16S	-	-	-
<i>Hydrophis curtus</i>	8021 – 8077	tRNA-Ser (S2) (98%)	-	-	-	-	-
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	2520 – 2540	-	-	rRNA – 16S	Transcrito de RNA	Variante de transcrito	-
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	3571 – 3592	-	Proteína de microorganismo	Região controle II	Transcrito de RNA	Variante de transcrito	-
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	6202 – 6249	tRNA-Asn (N) (57.1%)	-	-	-	-	-
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	8035 – 8085	tRNA-Ser (S2) (91.2%)	-	-	-	-	-
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	10988 – 11040	-	-	Início do ND4-L	Transcrito de RNA	Variante de transcrito	-
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	16442 – 16527	-	-	Região controle I	Transcrito de RNA	-	-
<i>Micrurus fulvius</i>	7968 – 8021	tRNA-Asp (D) (59.1%)	-	-	-	-	-
<i>Nerodia sipedon</i>	4636 – 5110	-	Proteína não caracterizada	Região controle II	Transcrito de RNA	Variante de transcripto	-
<i>Ophiophagus hannah</i>	16167 – 16193	tRNA-Ile (I) (69.2%)	Domínio proteico	Genoma de <i>Gadus morhua</i>	Transcrito de RNA de peixe	Variante de RNA	Genoma de <i>Rattus</i>
<i>Thermophis baileyi</i>	3565 – 3628	tRNA-Pro (P) (55%)	-	Região controle II	-	-	-
<i>Thermophis zhaoermii</i>	3561 – 3626	tRNA-Pro (P) (66.7%)	-	Região controle II	-	-	-
<i>Vipera berus</i>	8 – 63	-	-	Região controle I	-	-	-

APÊNDICE 11

Figura Suplementar 3 – Árvore filogenética obtida a partir do método de inferência Bayesiana a partir de uma matriz de 13 genes de proteínas codificantes e duas subunidades do mt rRNA. Os números próximos aos nós são os valores de suporte obtidos. Os mitogenomas 1 a 3J representam os mesmos mitogenomas descritos na figura 7. A cor de cada ramo indica o mitogenoma recuperado para a espécie ou família



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

APÊNDICE 12

Tabela Suplementar 7 – Genótipos de microssatélites obtidos para cada representante das populações *ex situ* (ID) e *in situ* (KB) de *Bothrops insularis*.

ID DA AMOSTRA	BMAR_076	BPAU_002	BPAU_014	BPAU_059	BPAU_083	BPAU_130	BMAT_010	BMAT_049	BMAT_060	BMAT_070	BMAT_080	BMAT_106
ID0002	196/200	233/238	247/247	117/133	261/261	147/147	258/266	153/153	138/138	117/117	193/193	167/173
ID0003	196/200	233/238	-	117/138	261/261	126/147	258/262	153/157	-	117/117	193/193	167/173
ID0004	196/200	229/233	251/251	133/138	261/264	126/147	258/262	153/157	133/138	117/117	190/193	167/173
ID0005	196/200	233/238	247/247	117/133	258/261	147/147	250/262	149/153	122/122	117/117	190/193	167/173
ID0006	196/200	233/238	247/251	117/117	261/264	126/147	-	-	121/121	117/117	193/193	167/173
ID0007	196/196	233/238	-	133/142	261/264	126/126	-	153/153	-	117/117	193/193	167/173
ID0008	196/196	233/238	247/247	117/133	261/264	147/147	258/262	153/153	133/138	117/117	193/193	167/173
ID0009	196/200	233/238	247/251	133/138	258/261	126/147	262/266	153/157	133/138	117/117	190/193	167/173
ID0010	196/200	238/243	247/247	133/138	261/264	126/147	258/262	153/153	121/138	117/117	193/193	167/173
ID0011	196/196	233/233	247/247	133/142	261/264	126/147	262/270	153/153	121/138	117/117	193/193	167/173
ID0012	196/196	233/238	247/251	117/117	261/264	147/147	258/262	153/157	121/121	117/121	193/193	167/173
ID0013	196/196	233/238	247/251	117/117	261/264	147/147	258/262	153/157	121/121	117/121	193/193	167/176
ID0016	196/200	-	-	117/133	261/261	147/147	-	153/157	-	117/117	193/193	167/173
ID0017	196/196	-	-	97/138	261/264	126/147	-	153/153	121/121	117/117	193/193	167/167
ID0018	196/200	233/238	247/251	133/138	261/264	-	258/262	153/157	129/138	117/117	193/193	167/173
ID001F	196/196	233/238	247/251	117/142	261/264	126/126	262/262	153/157	121/121	-	-	167/173
ID002F	196/200	233/238	247/251	117/117	261/264	126/147	262/270	153/157	121/129	117/121	193/193	167/173
ID004F	196/200	-	247/251	117/117	261/261	147/147	262/270	153/157	129/133	117/121	193/193	167/173
ID005F	-	-	247/247	-	261/261	-	-	-	138/138	-	-	167/167
ID006F	196/200	-	247/247	113/138	261/261	147/147	258/262	153/153	121/133	117/121	193/193	167/173
ID009F	196/200	233/238	247/247	117/133	261/264	147/147	262/266	153/153	121/133	117/117	193/193	-
ID011F	196/200	233/233	247/251	117/133	261/261	126/147	262/266	153/157	129/133	117/121	193/193	167/173
ID013F	196/200	-	247/247	117/138	261/264	126/126	-	153/153	121/121	117/117	193/193	167/173
ID014F	196/196	238/243	-	117/133	261/261	126/126	258/262	153/157	-	117/117	-	167/173
ID015F	196/200	233/238	247/251	117/138	261/264	126/147	258/262	153/157	121/129	117/117	193/193	-
ID017F	196/196	238/238	247/251	117/138	261/261	-	258/262	153/157	121/138	117/121	193/193	167/173
ID021F	196/200	233/238	247/251	117/138	261/261	147/147	258/262	153/157	121/133	117/121	193/193	167/173
ID022F	196/200	233/238	247/251	117/142	261/261	126/147	258/262	153/157	121/138	117/121	193/193	167/173
ID024F	196/196	233/233	247/251	117/133	261/264	147/147	258/262	153/157	121/138	117/121	193/193	167/173
ID01FF	196/200	233/238	251/251	133/138	261/264	126/126	262/266	153/157	133/138	117/117	190/193	167/173

Continuação da Tabela Suplementar 7 – Genótipos de microssatélites obtidos para cada representante das populações *ex situ* (ID) e *in situ* (KB) de *Bothrops insularis*.

ID DA AMOSTRA	BMAR_076	BPAU_002	BPAU_014	BPAU_059	BPAU_083	BPAU_130	BMAT_010	BMAT_049	BMAT_060	BMAT_070	BMAT_080	BMAT_106
ID02FF	196/200	233/238	247/251	133/133	261/264	147/147	258/262	153/157	133/138	117/117	193/193	167/173
ID03FF	196/200	233/238	247/251	133/138	261/264	126/147	262/266	153/157	133/138	117/117	193/193	167/173
ID04FF	196/200	233/238	247/251	-	261/264	147/147	258/262	153/157	133/138	117/117	193/193	167/173
ID05FF	196/200	233/238	247/251	133/138	261/264	126/126	262/266	153/157	133/138	-	193/193	167/173
ID06FF	196/200	238/238	247/247	133/133	-	-	258/262	153/153	-	117/117	193/193	167/173
ID08FF	196/196	233/238	247/247	133/133	261/278	147/147	258/262	153/153	-	117/121	193/193	167/173
ID09FF	196/200	233/238	247/247	117/133	264/278	147/147	262/262	153/153	133/138	117/117	193/193	167/173
ID11FF	196/200	233/238	247/247	117/117	261/261	126/147	-	153/153	121/121	117/117	193/193	167/173
ID12FF	196/200	233/238	247/247	117/138	261/264	147/147	258/262	153/153	121/129	117/121	193/193	167/173
ID13FF	196/200	-	-	-	261/264	147/147	258/262	153/157	121/138	117/117	193/193	167/173
ID14FF	196/196	233/238	247/251	117/133	261/261	147/147	258/262	153/157	121/129	117/121	193/193	167/173
ID16FF	196/196	233/238	247/251	117/138	261/261	126/147	262/266	153/157	138/138	117/117	193/193	167/173
ID19FF	196/196	233/238	247/247	117/138	261/261	126/147	262/266	153/153	138/138	117/117	193/193	167/173
ID20FF	196/196	233/238	247/247	133/138	261/261	126/147	262/266	153/153	133/133	117/117	193/193	167/173
ID21FF	196/196	233/233	247/251	133/138	261/261	126/147	262/266	153/157	129/133	117/117	193/193	167/173
ID22FF	196/200	233/238	247/251	117/138	261/261	126/147	258/262	153/157	133/133	117/117	193/193	167/173
ID23FF	196/196	233/238	-	-	-	126/147	-	153/153	-	117/117	-	-
ID26FF	196/196	-	247/251	117/117	-	126/147	262/266	153/157	121/138	121/121	193/193	167/173
ID27FF	196/200	233/233	247/247	117/117	261/261	126/147	262/266	153/153	121/138	117/121	193/193	167/173
KB0001	200/200	238/238	247/247	-	-	147/147	262/266	153/153	121/121	113/117	193/193	-
KB0002	196/200	233/238	251/251	-	261/264	126/147	262/262	157/157	121/133	113/117	193/193	167/173
KB0003	196/200	238/238	247/247	138/138	261/264	126/147	262/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173
KB0004	196/200	238/238	247/251	133/138	-	126/147	262/262	153/157	121/137	113/117	193/193	167/173
KB0005	196/200	233/238	247/247	117/138	-	126/147	262/266	153/153	121/137	113/117	193/193	167/173
KB0006	200/200	233/238	247/247	133/133	261/264	147/147	262/270	153/153	121/137	113/117	193/193	167/173
KB0007	196/200	233/238	247/247	-	-	147/147	262/262	153/153	125/133	117/121	207/207	167/173
KB0008	196/196	233/233	247/251	117/133	-	147/147	262/262	153/157	121/137	113/117	193/193	167/173
KB0009	196/200	233/238	238/247	133/138	258/261	126/147	262/262	153/153	129/129	113/117	204/207	167/173
KB0010	196/196	233/238	247/247	133/138	261/261	126/147	262/262	153/153	121/129	113/117	193/193	167/173
KB0011	196/200	233/238	251/251	117/133	261/264	147/147	266/266	157/157	121/129	113/117	193/193	167/173
KB0012	196/196	233/238	243/247	117/117	-	147/147	262/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173
KB0013	196/200	233/238	243/247	138/138	261/261	147/147	262/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173

Continuação da Tabela Suplementar 7 – Genótipos de microssatélites obtidos para cada representante das populações *ex situ* (ID) e *in situ* (KB) de *Bothrops insularis*.

ID DA AMOSTRA	BMAR_076	BPAU_002	BPAU_014	BPAU_059	BPAU_083	BPAU_130	BMAT_010	BMAT_049	BMAT_060	BMAT_070	BMAT_080	BMAT_106
KB0007	196/200	233/238	247/247	-	-	147/147	262/262	153/153	125/133	117/121	207/207	167/173
KB0008	196/196	233/233	247/251	117/133	-	147/147	262/262	153/157	121/137	113/117	193/193	167/173
KB0009	196/200	233/238	238/247	133/138	258/261	126/147	262/262	153/153	129/129	113/117	204/207	167/173
KB0010	196/196	233/238	247/247	133/138	261/261	126/147	262/262	153/153	121/129	113/117	193/193	167/173
KB0011	196/200	233/238	251/251	117/133	261/264	147/147	266/266	157/157	121/129	113/117	193/193	167/173
KB0012	196/196	233/238	243/247	117/117	-	147/147	262/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173
KB0013	196/200	233/238	243/247	138/138	261/261	147/147	262/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173
KB0014	196/196	233/233	247/247	117/133	261/261	126/147	258/262	153/153	121/129	109/113	193/193	167/173
KB0015	196/200	233/238	243/247	133/138	261/264	147/147	262/262	153/153	121/121	113/117	193/193	167/173
KB0016	196/200	233/248	247/251	133/138	261/261	147/147	262/266	153/157	133/137	117/121	193/193	167/173
KB0017	196/196	233/238	247/247	142/142	261/261	147/147	262/262	153/153	125/133	113/117	193/193	167/173
KB0018	196/200	233/238	247/247	138/138	261/261	126/147	262/262	153/153	121/121	113/117	193/193	167/173
KB0019	196/200	233/238	247/247	-	261/261	147/147	258/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173
KB0020	196/200	233/238	-	117/138	261/261	126/147	262/262	153/153	121/137	113/117	193/193	167/173
KB0021	200/200	233/238	247/251	117/138	264/264	126/147	-	153/157	121/121	113/117	193/193	167/173
KB0022	200/200	233/233	247/247	117/138	261/261	147/147	262/266	153/153	121/121	113/117	193/193	167/173
KB0023	196/200	238/248	247/247	117/133	261/261	147/147	262/262	153/153	121/121	117/121	193/193	167/173
KB0024	196/200	233/233	247/247	133/138	261/264	147/147	266/270	153/153	125/133	113/117	193/193	167/173
KB0025	200/200	233/238	247/251	117/133	261/261	147/147	262/266	157/157	121/133	113/117	193/193	167/173
KB0026	196/200	233/238	243/247	117/133	261/261	126/147	258/266	153/153	133/137	113/117	193/193	167/173
KB0027	200/200	233/238	-	117/133	261/264	147/147	258/266	153/153	125/133	113/117	193/193	167/173
KB0028	200/200	-	-	-	261/264	126/147	262/262	153/157	121/121	113/117	193/193	167/173
KB0029	196/200	-	-	-	261/264	147/147	258/262	153/157	121/121	113/117	193/193	167/173
KB0030	196/200	-	-	-	261/261	147/147	262/262	153/157	133/133	113/117	193/193	167/173
KB0031	196/200	-	-	-	258/261	147/147	262/266	153/157	133/137	113/117	193/193	-

Nota: (-) = Ausência de amplificação.

APÊNDICE 13

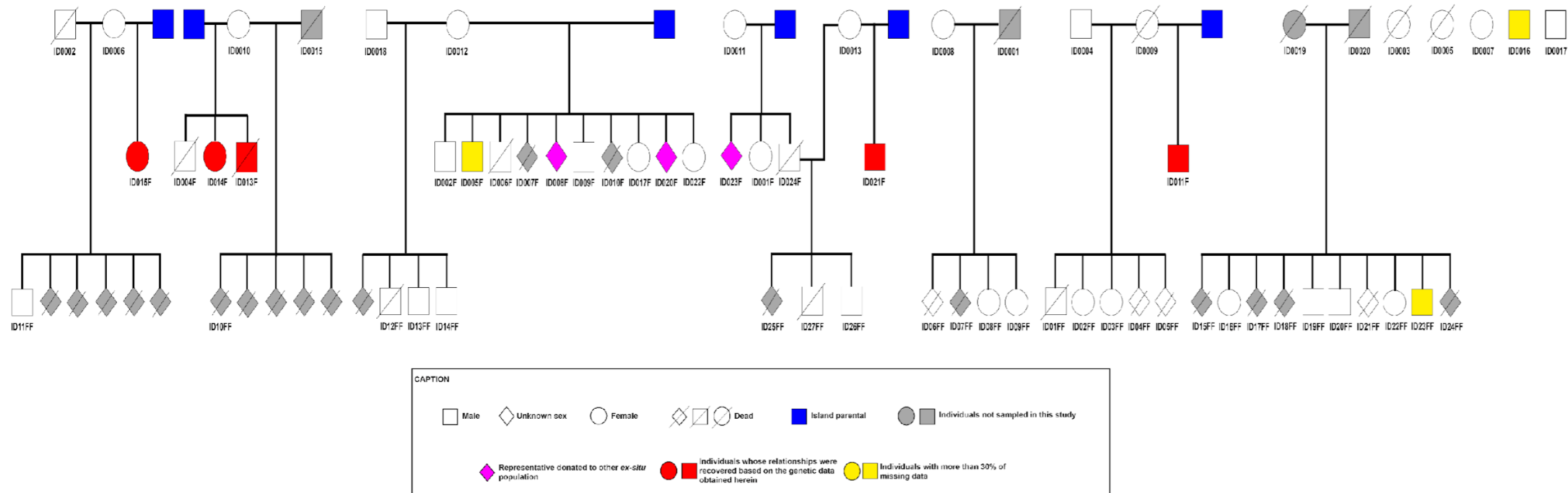
Tabela Suplementar 8 – Valor do coeficiente de parentesco (R) obtido para cada representante da população *ex situ* de *Bothrops insularis*.

Samples ID	ID0004	ID0006	ID0007	ID0008	ID0009	ID0010	ID0011	ID0012	ID0013	ID0017	ID0018	ID001F	ID002F	ID006F	ID009F	ID011F	ID014F	ID015F	ID017F	ID022F	ID01FF	ID02FF	ID03FF	ID08FF	ID09FF	ID11FF	ID13FF	ID14FF	ID16FF	ID19FF	ID20FF	ID22FF	ID26FF	ID27FF		
ID0004	0																																			
ID0006	0	1	0																																	
ID0007	0	0.06	1																																	
ID0008	0.1	0	0.46	1																																
ID0009	0.48	0.14	0	0	1																															
ID0010	0.29	0.07	0.32	0.32	0.06	1																														
ID0011	0	0	0.71	0.4	0	0.32	1																													
ID0012	0	0.47	0.01	0.19	0	0	0	1																												
ID0013	0	0.47	0.01	0.19	0	0	0	1	1																											
ID0017	0	0.47	0.37	0.19	0	0.5	0.46	0.21	0.21	1																										
ID0018	0.39	0.47	0.06	0.06	0.34	0.33	0	0.28	0.28	0	1																									
ID001F	0	0.61	0.67	0	0	0	0.5	0.47	0.47	0.3	0.14	1																								
ID002F	0	0.76	0	0	0.02	0	0.14	0.48	0.48	0	0.25	0.5	1																							
ID006F	0	0	0	0.1	0	0.26	0	0.02	0.02	0	0	0	0	1																						
ID009F	0	0.5	0.19	0.54	0.03	0.08	0.02	0	0	0	0	0	0	0.31	1																					
ID011F	0	0	0	0	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0.16	0	0.5	0	0.07	1																		
ID014F	0	0	0.29	0.2	0	0.5	0	0	0	0	0.03	0.19	0	0	0	0.04	1																			
ID015F	0.21	0.73	0	0	0.14	0.14	0	0.51	0.51	0.5	0.77	0.5	0.53	0	0	0.11	0	1																		
ID017F	0	0	0	0	0	0	0	0.56	0.56	0.07	0	0.48	0.02	0.3	0	0.09	0.38	0.2	1																	
ID022F	0	0.41	0.33	0	0.02	0.12	0.18	0.53	0.53	0	0.26	0.54	0.32	0.14	0	0.32	0	0.33	0.57	1																
ID01FF	0.63	0	0.23	0.07	0.73	0.07	0	0	0	0	0.35	0.19	0	0	0.14	0.31	0.1	0.01	0	0	1															
ID02FF	0.49	0.31	0	0.62	0.26	0.21	0	0.35	0.35	0	0.77	0.04	0.14	0	0.41	0	0	0.48	0	0.17	0.27	1														
ID03FF	0.44	0.54	0.29	0.11	0.72	0.22	0	0	0	0	0.63	0.04	0.31	0	0.46	0.23	0	0.45	0	0.11	0.76	0.62	1													
ID08FF	0	0	0	0.52	0	0.03	0.1	0.3	0.3	0	0	0	0	0.41	0.12	0	0	0	0.06	0.01	0	0.24	0	1												
ID09FF	0	0	0	0.69	0.06	0.2	0.26	0	0	0	0	0	0	0.02	0.65	0	0	0	0	0	0.06	0.53	0.1	0.5	1											
ID11FF	0	0.61	0	0	0	0.14	0.04	0.16	0.16	0.31	0	0.35	0.24	0.11	0.5	0	0.17	0.37	0.05	0.34	0	0	0	0	0.14	1										
ID13FF	0.35	0.54	0	0.54	0	0.55	0.12	0.58	0.58	0.23	0.83	0	0.05	0.11	0.23	0	0.14	0.51	0.3	0.37	0.09	0.84	0.22	0.01	0.5	0.11	1									
ID14FF	0	0	0	0.23	0	0	0	0.69	0.69	0	0.37	0	0.29	0.15	0	0.52	0.41	0.29	0.63	0.35	0	0.18	0	0.54	0	0	0.12	1								
ID16FF	0	0.02	0	0	0.45	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0.22	0.14	0.32	0.54	0.1	0.5	0	0.6	0	0	0	0	0.1	1							
ID19FF	0	0	0.14	0.32	0.18	0.19	0.12	0	0	0.14	0	0	0	0	0.18	0.02	0	0.05	0.3	0	0.03	0	0.45	0	0.02	0.35	0	0	0.69	1						
ID20FF	0	0	0.5	0.48	0.33	0.2	0.02	0	0	0.14	0.06	0	0	0.33	0.5	0.35	0.05	0	0	0	0.18	0.09	0.56	0.26	0.13	0.35	0	0	0.32	0.64	1					
ID22FF	0.39	0.28	0	0.05	0.28	0	0	0.03	0.03	0	0.41	0	0.11	0.41	0	0.26	0.24	0.66	0.33	0.49	0.37	0.33	0.52	0	0	0.14	0.26	0.17	0.48	0.17	0.24	1				
ID26FF	0	0.26	0	0	0.16	0	0.06	0.5	0.5	0	0	0.5	0.45	0	0	0.35	0	0	0.59	0.55	0	0	0.24	0	0	0.05	0.08	0.43	0.46	0.18	0.1	0	1			
ID27FF	0	0.39	0	0	0	0.19	0.23	0.15	0.15	0	0	0	0.14	0.24	0.43	0.4	0	0	0.06	0.35	0	0	0.02	0	0	0.62	0.01	0	0.42	0.5	0.21	0	0.6	1		
Média	0.14	0.27	0.17	0.22	0.16	0.19	0.14	0.25	0.25	0.15	0.25	0.22	0.20	0.12	0.19	0.15	0.11	0.27	0.21	0.25	0.18	0.26	0.28	0.13	0.14	0.19	0.27	0.21	0.19	0.17	0.21	0.23	0.21	0.18		

Nota: A tabela mostra somente os 34 indivíduos vivos atualmente no plantel. A média de parentesco da população *ex situ* é calculada a partir da média da média do parentesco de cada indivíduo.

APÊNDICE 14

Figura Suplementar 4 – Reconstrução do pedigree da população de *Bothrops insularis ex-situ* mantida no Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. As relações apresentadas no genograma foram recuperadas de acordo com as informações de manejo, obtidas até Setembro de 2019, e os dados genéticos gerados nesse estudo. Azul = Indivíduos parentais da ilha. Rosa = Indivíduos doados a outra população cativa de *B. insularis*. Cinza = Indivíduos mortos dos quais não foram obtidas amostras de tecido. Amarelo = Indivíduos que apresentam mais de 30% de *missing data*. Vermelho = Descendentes cujas relações maternas foram encontradas nesse estudo.



Fonte: Igor Salles de Oliveira.

APÊNDICE 15

Artigo publicado: Salles-Oliveira I, Machado T, Banci KRS, Almeida-Santos SM, Silva MJJ. (2020). Genetic variability, management, and conservation implications of the critically endangered Brazilian pitviper *Bothrops insularis*. *Ecology and Evolution*, 10 (23): 12870 – 12882. DOI: 10.1002/ece3.6838.

Genetic variability, management, and conservation implications of the critically endangered Brazilian pitviper *Bothrops insularis*

Igor Salles-Oliveira  | Taís Machado  | Karina Rodrigues da Silva Banci  |
Selma M. Almeida-Santos  | Maria José de J. Silva 

Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

Correspondence

Maria José de J. Silva, Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, Av. Dr. Vital Brazil, 1500 – 05503-000 – São Paulo, SP, Brazil.
Email: mariajose.silva@butantan.gov.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Proc. # 2012/07334-9; # 2014/02558-2; and # 2017/04774-1; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico: 202686/2013-2; Fundação Butantan (Publication and english review fees).

[Correction Statement: Correction added on 23 October 2020 after first online publication: The name of the software GENEIOUS v.7.1.7 and the name of the author Karina Rodrigues da Silva Banci have been corrected in this version]

Abstract

Information on demographic, genetic, and environmental parameters of wild and captive animal populations has proven to be crucial to conservation programs and strategies. Genetic approaches in conservation programs of Brazilian snakes remain scarce despite their importance for critically endangered species, such as *Bothrops insularis*, the golden lancehead, which is endemic to Ilha da Queimada Grande, coast of São Paulo State, Brazil. This study aims to (a) characterize the genetic diversity of ex situ and in situ populations of *B. insularis* using heterologous microsatellites; (b) investigate genetic structure among and within these populations; and (c) provide data for the conservation program of the species. Twelve informative microsatellites obtained from three species of the *B. neuwiedi* group were used to access genetic diversity indexes of ex situ and in situ populations. Low-to-medium genetic diversity parameters were found. Both populations showed low—albeit significant—values of system of mating inbreeding coefficient, whereas only the in situ population showed a significant value of pedigree inbreeding coefficient. Significant values of genetic differentiation indexes suggest a small differentiation between the two populations. Discriminant analysis of principal components (DAPC) recovered five clusters. No geographic relationship was found in the island, suggesting the occurrence of gene flow. Also, our data allowed the establishment of six preferential breeding couples, aiming to minimize inbreeding and elucidate uncertain parental relationships in the captive population. In a conservation perspective, continuous monitoring of both populations is demanded: it involves the incorporation of new individuals from the island into the captive population to avoid inbreeding and to achieve the recommended allelic similarity between the two populations. At last, we recommend that the genetic data support researches as a base to maintain a viable and healthy captive population, highly genetically similar to the in situ one, which is crucial for considering a reintroduction process into the island.

KEY WORDS

genetic variability, in situ and ex situ conservation, population structure, Serpentes, SSR

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Ecology and Evolution* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Genetic diversity is one of the three classes of biodiversity recognized as global conservation priorities and plays a decisive role in conservation efforts (AZA, 2020; IUCN – International Union for Conservation of Nature, 2019; Sodhi & Ehrlich, 2010). Genetic diversity data on wild and captive populations have shown to be useful for evaluating the consequences of fragmentation and habitat loss, elucidating gene flow and population genetic structure, and defining important evolutionary areas (see Arruda et al., 2017; Gallego-García et al., 2018; Madsen et al., 2000; McAliley et al., 2016; Michaelidis et al., 2015; Monzón-Argüello et al., 2015; Wallis, 2019). However, a recent review on 30 years of conservation genetics in New Zealand, Wallis (2019) highlighted that genetic approaches have some limitations related to the definition of minimum viable populations, eco-sourcing, inference of gene flow, and species boundaries. To address these limitations, genetic approaches should grief with other knowledges (for example, demography and reproductive traits) in an integrative conservation effort (Allendorf et al., 2013).

Both ex situ and in situ conservation programs focus on retaining genetic diversity for a minimum period—usually 100 years (Frankham et al., 2008). However, demographic variations associated with captive adaptation, anthropogenic impacts, or the occurrence of inbreeding lead to a decrease in genetic diversity. In several cases, this may carry populations toward an extinction vortex and imminent extinction, as occurred to the isle royal wolves (*Canis lupus*) (Frankham, 2005; Frankham, 2010; Hedrick et al., 2019; West et al., 2018). Based on this, the management of wild and captive populations has focused on the maintenance of a viable population and its genetic diversity through the avoidance of inbreeding and captive adaptation, and a continuous monitoring of demographic events and genetic diversity (IUCN, 2002; Shafer et al., 2015).

Brazil is considered as a megadiverse South American country due to its high levels of species richness and endemism, with biodiversity hotspot regions (e.g., Cerrado, Rainforest; ICMBio/MMA, 2018a). The last census of Brazilian fauna identified 34 snake species classified as vulnerable, endangered, or critically endangered (ICMBio/MMA, 2018b), most of which are incorporated into national conservation plans. Other than improvement of Brazilian snakes conservation (Navega-Gonçalves & Porto, 2016), only one study focuses on genetic data using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in *Bothrops moojeni* populations (see Dutra et al., 2008).

The genus *Bothrops* is a neotropical pitviper group widely distributed in Brazil, which plays an important ecologic role, apart from its utility in medicine (Campbell & Lamar, 2004). This genus encompasses 45 species (Uetz, Freed, & Hošek, 2020), 10 out of which are described as endemic and/or threatened or near-threatened (Navega-Gonçalves & Porto, 2016; Rodrigues, 2005). The golden lancehead, *Bothrops insularis*, is an endemic and critically endangered species from Ilha da Queimada Grande (Marques et al., 2002), a small island (0.43 km²) located 33 km off the coast of São Paulo State (24°30'S and 43°42'O) that is part of a conservation unit classified as

"Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) das Ilhas da Queimada Pequena e Queimada Grande" (Brasil, 1985).

Even though the access in the island is restricted to the marine and authorized scientific researchers, natural and deliberative bushfires, and anthropogenic actions such as capture of specimens and biopiracy have already been reported (Duarte et al., 1995; Guimarães et al., 2014; Martins et al., 2008). These threats associated with restricted geographic distribution and evidence of populational decline lead this species to be classified as critically endangered (according to the parameters B1ab (iii) + 2ab (iii)) by the International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2019) and the Red List of Brazilian Fauna (ICMBio/MMA, 2018b).

The majority of the studies with *B. insularis* focused predominantly on ecology (Guimarães et al., 2014; Marques et al., 2012; Martins et al., 2008), reproduction (Amorim et al., 2019; Marques et al., 2013; Silva et al., 2015), and phylogeography (Grazziotin et al., 2006). Populational genetics and molecular parameters of the species, however, remain scarce, even though accumulation of genetic information and maintenance of genetically viable ex situ populations of the species were a component of the aims included in a national plan specific for insular herpetofauna (Bataus et al., 2011), which may allow the design of future reintroduction plans.

Based on this brief historic, due to this species vulnerability, ex situ conservation programs have been designed in Brazilian scientific centers, such as the Instituto Butantan. The ex situ population housed at the Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, was established in 2009/2010 with 20 founders (IBAMA no. 25.650-1), aiming to develop a healthy population which could be used for either scientific researches or future reintroduction (Kasperovicz & Almeida-Santos, 2012). Up to now, breeding couples were designed based on the sperm health and viability for male's selection (Silva et al., 2015), and x-ray analysis to select females in vitellogenesis. Although mating was reported, no study book was maintained for this population.

In this context, knowing that the access of genetic data of wild and captive populations is crucial for conservation programs, our study aims to: (a) characterize the genetic diversity of ex situ and in situ populations of *B. insularis* using heterologous microsatellites; (b) investigate the existence of genetic structures among and within populations; and (c) provide data for the conservation program of the species.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection

A total of 80 samples from representatives of *B. insularis* (Figure 1) were used in this study: 49 specimens belonging to an ex situ population maintained at the Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV), Instituto Butantan (São Paulo State, Brazil; sampling area 1; Figure 2a; Appendix S1), 31 specimens belonging to the in situ population from Ilha da Queimada Grande (São Paulo State, Brazil;

Figure 2b; Appendix S1), 12 of them were taken in sampling area 2, and 19 in sampling area 3 (Figure 2b). We are using sampling area terminology because of the low accuracy of GPS data in the island, so the centroid point from each area was used as the geographic coordinate of the island representatives.

2.2 | Microsatellites amplification and genotyping

Genomic DNA was extracted from the ventral scales or liver, according to Walsh et al. (1991). Thirty-three pairs of primers developed for three species of the *B. newiedi* group (*B. marmoratus*—Bmar; *B. mato-grossensis*—Bmat; and *B. pauloensis*—Bpau) were used to amplify DNA sequences of *B. insularis* samples (Appendix S2). Loci were amplified

with a final volume of 15 μ l comprising 3.993 μ l milli-Q water, 1.5 μ l 10x PCR buffer, 0.45 μ l $MgCl_2$ (50 mM), 0.282 μ l dNTPs (5 mM), 0.4 μ l forward primers with a M13 tail (1 mM), 0.4 μ l reverse primers (10 mM), and 0.4 μ l of a M13 primer (FAM-, NED-, PET-, or VIC-labeled; 10 mM), 0.075 μ l Platinum Taq polymerase (1 U/ μ l; Invitrogen), and 7.5 μ l DNA template at a concentration of 60 ng/ μ l. Reactions were performed on a LifeEco Bioer Thermocycler as described by Machado (2015), but the annealing was reduced to 45 and 30 s in the touchdown and normal cycles, respectively. Microsatellite fragment lengths were obtained through a capillary sequencer (Prism 3730XL Genetic Analyzer; Applied Biosystems) at the "Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano", Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (IB-USP). Each microsatellite fragment was scored using the GENEIOUS v.7.1.7 software (Kaerse et al., 2012).



FIGURE 1 *Bothrops insularis* from Ilha da Queimada Grande, São Paulo State, Brazil. Source: Karina Banci

2.3 | Genetic analyses

Details and the script used for the analysis performed in the software R v.3.5.1 (R Core Team, 2018) are available in the Appendix S3. The following sections will focus on reporting the parameters, packages, and software used. Critical probability values ($p \leq .05$) for all tests described herein were adjusted with a sequential Bonferroni correction (Rice, 1989).

2.4 | Data quality control, linkage disequilibrium, and Hardy–Weinberg equilibrium tests

Missing percentages were accessed through POPPR v.2.8.1 package (Kamvar et al., 2014, 2015), and loci and individuals with more

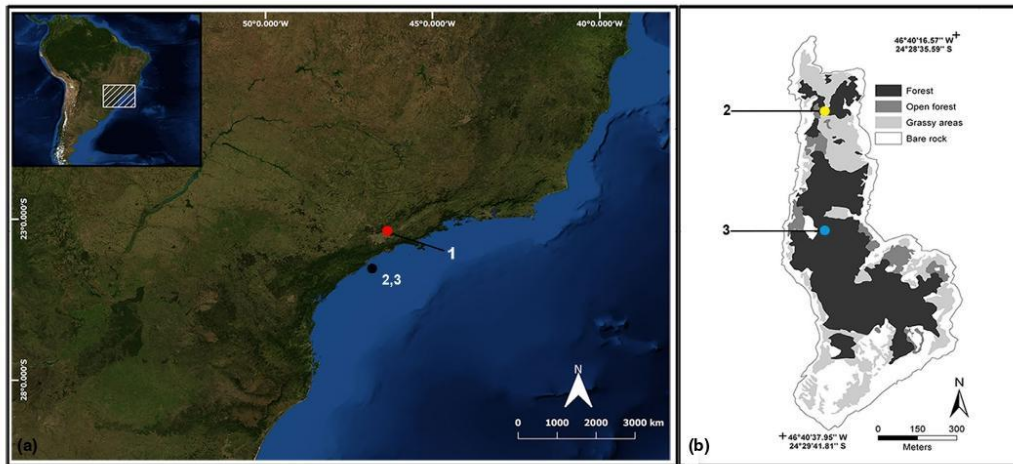


FIGURE 2 Sampling locations of the *Bothrops insularis* populations. (a) São Paulo state representation showing locations of the ex situ (1—red circle) and in situ (2 and 3—black circle) populations. (b) Topographic map of the Ilha da Queimada Grande, São Paulo State, Brazil—use authorized by Martins et al. (2008)—with modifications, showing sampling sites (2—yellow circle; 3—light blue circle)

than 30% missing data were excluded from the analyses. The occurrence of null alleles and stuttering was investigated using the software Micro-Checker v.2.2.3 (VanOosterhout et al., 2004). Disequilibrium linkage tests were performed pair-by-pair for each population and a matrix containing all data using ADEGENET v.2.1.1 package (Jombart, 2008). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test was performed in PEGAS v.0.11 package (Paradis, 2010) with 1,000 permutations.

2.5 | Genetic diversity indexes

The number of alleles (A) and the number of private alleles (PA) were calculated using POPPR. Allelic richness was obtained using HIERFSTAT v.0.44-22 package (Goudet, 2005). Additionally, the observed and expected heterozygosity indexes were inferred through the basic package implemented in R.

2.6 | Inbreeding indexes

The literature presents two different inbreeding coefficients that possess distinct biological meanings. The inbreeding coefficient (F_{is}) evaluates the mating system in the population, and the inbreeding coefficient of the genogram or per kinship (f_{is}) assesses the individual probability of exhibiting an allele that is identical by descent (IBD) due to its parental relationships (Templeton, 2011).

Since both biological meanings offer different insights for conservation, we investigated the inbreeding coefficient for the mating system (F_{is}) using the FSTAT v.2.9.3.2 software (Goudet, 2002), and the average individual inbreeding coefficient per kinship (f_{is}) in each population using ADEGENET. Significance of each index was obtained using bootstrap, with 1,000 permutations.

2.7 | Bottleneck in the in situ population

The Bottleneck software (Piry et al., 1999) was used to test for a recent demographic reduction in the in situ population. The analysis was performed with 1,000 iterations under two models: the infinite allele model (IAM) and the stepwise mutation model (SMM). Sign up and Wilcoxon tests were used to infer recent bottleneck signals, through significant heterozygosity excess.

2.8 | Populational genetic structure

Offspring representatives from the ex situ population were excluded of the genetic differentiation and structure analyses in order to avoid bias.

Populational differentiation coefficients are sorted in three classes: (a) the classical Wright's F_{st} , (b) the standardized analogues F_{st}^* , and (c) D_{est} . Though none of these indexes are considered an

ideal summary statistic, combining them may increase accuracy in attempts to elucidate demographic and genetic population structure (Meirmans & Hedrick, 2011). Wright's F_{st} was calculated using FSTAT. Hendrick's G_{st}^* and Jost's D_{est} indexes were obtained using MMOD (Winter, 2012). AMOVA was performed with POPPR package. Significances of each index and AMOVA were obtained using bootstrap with 1,000 permutations.

Genetic structure within and among populations was analyzed with two approaches: (a) the Bayesian clustering method applied in STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000) and (b) the Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC; Jombart et al., 2010) implemented in the ADEGENET v.2.1.1 (Jombart, 2008).

STRUCTURE analyses were conducted without origin prior and testing an admixture model. Initially, we performed ten independent runs for one cluster ($K = 1$) to address the best allele model, and initial λ value to be used in the analyses (Janes et al., 2017; Porras-Hurtado et al., 2013). Then, we investigated the probability of different number of clusters (K) from one to six, with a burn-in of 500,000, followed by 1,000,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) steps, repeated 30 times. The most probable number of genetic clusters was investigated through the comparisons of the: (a) medium α values obtained for the 30 runs of each K ; (b) the symmetry distribution of each cluster in the plot generated for each K ; (c) the Prob (Ln)K Method; and (d) the Evanno Method (Evanno et al., 2005) performed in STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2012). Data were summarized with Clumpp v.1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) and visualized with Distruct v.1.1 (Rosenberg, 2004).

For the DAPC analysis, the number of clusters (K) was estimated from one to ten using the lowest value of the Bayesian information criterion (BIC) retaining 30 principal components (PCs) using ADEGENET. We increased the numbers of possible K to 10 to improve the visualization of the plot obtained for BIC values. Subsequently, we conducted an initial DAPC analysis with parameters of 25 PCs, three discriminant analyses, and assuming K number of genetic clusters obtained in the step above. Once bias became possible as a result of the excess of PCs used, the correct number of PCs (i.e., six) was accessed, and the results were validated via the a-scored method.

2.9 | Genetic and breeding management of the ex situ *B. insularis* population

Kinship coefficient values were inferred for 37 captive individuals, 34 of which were alive at the final stage of this study, through the ML-Relate software (Kalinowski et al., 2006). Based on these values, we analyzed (a) the relationship between each pair of possible reproductive individuals, based on Wang (2011), and (b) two cases of uncertain relationship in the captive population. The first case was of uncertain paternity among the possible fathers (ID0001 and ID011F) and three offspring (ID06FF, ID08FF, and ID09FF); the second case was related to the uncertain maternity among the founder females and five offspring (ID011F, ID013F, ID014F, ID015F, and ID021F).

3 | RESULTS

After data quality, linkage disequilibrium and null alleles tests have been performed, a total of 21 loci and four individuals had to be excluded from the study (Appendix S4) because heterologous amplification was not successful in eleven loci; excessive mistyping and missing data (>30%) were found in three loci and four individuals; evidence of linkage disequilibrium and null alleles were recovered in two and five loci, respectively. Therefore, populational analyses were conducted on the basis of a genetic matrix (Appendix S5) containing 79 individuals (49 ex situ and 30 in situ) and 12 loci (namely Bmar_076, Bpau_002, Bpau_014, Bpau_059, Bpau_083, Bpau_130, Bmat_010, Bmat_049, Bmat_060, Bmat_070, Bmat_080, Bmat_106).

After sequential Bonferroni correction, nine loci (four of the in situ population; five of the ex situ population) indicate a significant deviation from the HWE ($p \leq .004$), evincing that the populations did not show a congruent pattern in HWE departure. However, the only locus that showed HWE deviation in both the ex situ and in situ populations was Bmat_106; therefore, it was removed from subsequent analyses to avoid bias.

3.1 | Genetic diversity

The final 11 microsatellites showed similar values of genetic diversity indexes between the populations (Table 1). The number of alleles (A) varied from 2–6 for each locus considering both populations, with a total of 37 and 36 alleles in the ex situ and in situ populations, respectively. Allele richness (AR) ranged from 1.95 to 5 considering both populations. Moreover, the ex situ and in situ populations contain 10 and nine private alleles, respectively. Observed

(Ho) and expected heterozygosity (He) were, on average, similar to both populations ($Ho_{ex\ situ} = 0.59$, $Ho_{in\ situ} = 0.53$, $He_{ex\ situ} = 0.48$, and $He_{in\ situ} = 0.47$), with the lowest heterozygosity indexes in the locus Bmat_080 in both populations.

3.2 | Inbreeding

We obtained negative and significant average values of F_{is} for both populations ($F_{is\ ex\ situ} = -0.24/CI = -0.43 < x < -0.06$ and $F_{is\ in\ situ} = -0.12/CI = -0.43 < x < 0.09$; Table 1). However, both populations showed positive f_{is} values, which were only significant in the in situ population ($f_{is\ ex\ situ} = 0.05/CI = -0.42 < x < -0.02$ and $f_{is\ in\ situ} = 0.06/CI = -0.40 < x < 0.10$).

3.3 | Bottleneck

Under the models tested, the results obtained showed no evidence of a recent bottleneck in the in situ population after Bonferroni sequential correction (IAM: 0.03; SMM: 0.55). However, it is worth mentioning that under the IAM model, nine out of 11 loci showed heterozygosity excess.

3.4 | Populational differentiation indexes

Levels of genetic differentiation between the populations are presented in Table 2. All of the genetic differentiation indexes recovered showed, on average, low but nevertheless significant values ($F_{st} = 0.07/CI = 0.01 < x < 0.13$, $G_{st} = 0.12/CI = 0.05 < x < 0.20$,

TABLE 1 Microsatellite diversity indexes for ex situ and in situ populations of *Bothrops insularis*

Locus	Repeat Motif	Populations											
		Ex situ						In situ					
		A	AR	PA	Ho	He	F_{is}	A	AR	PA	Ho	He	F_{is}
Bmar_076	(GAG) _n	2	2.00		0.63	0.44	-0.45	2	2.00		0.60	0.51	-0.19
Bpau_002	(TCTAC) _n	4	3.40	2	0.82	0.54	-0.54	3	2.98	1	0.78	0.55	-0.44
Bpau_014	(CCAT) _n	2	2.00		0.56	0.45	-0.26	4	3.92	2	0.40	0.45	0.12
Bpau_059	(ATCC) _n	6	5.00	2	0.75	0.70	-0.07	4	4.00		0.74	0.71	0.05
Bpau_083	(TCA) _n	4	3.55	1	0.61	0.46	-0.32	3	2.96		0.42	0.39	-0.06
Bpau_130	(GAG) _n	2	2.00		0.47	0.47	0.02	2	2.00		0.40	0.33	-0.23
Bmat_010	(ATGG) _n	5	4.48	1	0.95	0.64	-0.49	4	3.96		0.55	0.52	-0.06
Bmat_049	(TGGG) _n	3	2.51	1	0.62	0.44	-0.42	2	2.00		0.23	0.35	0.33
Bmat_060	(CCAT) _n	5	4.81	2	0.68	0.73	0.07	5	5.00	2	0.67	0.71	0.08
Bmat_070	(TCCA) _n	2	2.00		0.32	0.30	-0.06	4	3.76	2	1	0.57	-0.78
Bmat_080	(GAG) _n	2	1.95	1	0.09	0.09	-0.04	3	2.76	2	0.03	0.13	0.74
Average		3.36	3.06		0.59	0.48	-0.24	3.27	3.21		0.53	0.47	-0.12

Note: A = Number of alleles; AR = Allele richness; PA = Number of private alleles; Ho = Observed heterozygosity; He = Expected heterozygosity; F_{is} = Inbreeding mating system coefficient.

$D_{est} = 0.06/CI = 0.02 < x < 0.10$), which was corroborated by AMOVA results (variation between populations = 12%; $p < .001$). However, some loci show moderate to high values of genetic differentiation indexes (for instance, Bmat_070)—it seems to be related to both the existence of private alleles (Table 1) and the difference between the allelic frequencies within the populations (Appendix S5).

3.5 | Genetic structure

STRUCTURE analysis suggests the existence of one or two clusters according to the method used. The Prob (Ln)K Method recovered one genetic cluster ($K = 1$; Figure 3a). On the other hand, based on the Evanno Method, we recovered two clusters ($\Delta K = 2$; Figure 3b). Janes et al. (2017) highlight an inconsistency on the Evanno Method arguing that it has a tendency of choosing $K = 2$ as the most probable number of clusters, even when it is not true. Therefore, the authors and the STRUCTURE manual suggest that other parameters, such as the α value and the clusters distribution on the plots, should be revised to address the correct number of clusters considering the dataset. For all K tested, we recovered $\alpha > 1$ and a highly symmetric clusters distribution on the plots generated, which indicates no existence of subpopulations (Figure 3c).

DAPC analysis indicates the existence of five clusters according to BIC values ($K = 5$, Figure 4a), suggesting that there are genetic clusters not recovered in STRUCTURE. Thereafter, the DAPC recovered four clusters that are exclusive to one population, represented by yellow for the ex situ population and by red, green, and blue for the in situ population (Figure 4c). None spatial relationships among the clusters in the island population were found (Figure 4c).

TABLE 2 Genetic differentiation indexes of the ex situ and in situ *Bothrops insularis* populations

Locus	F_{st}	G_{st}'	D_{est}
Bmar_076	0.098	0.179	0.092
Bpau_002	-0.007	0.000	0.000
Bpau_014	-0.005	0.000	0.000
Bpau_059	-0.010	0.000	0.000
Bpau_083	0.035	0.047	0.023
Bpau_130	0.035	0.042	0.017
Bmat_010	0.089	0.191	0.124
Bmat_049	-0.026	0.000	0.000
Bmat_060	0.077	0.293	0.230
Bmat_070	0.316	0.543	0.297
Bmat_080	0.015	0.026	0.004
Average	0.07 (0.01 < x < 0.13)	0.12 (0.05 < x < 0.20)	0.06 (0.02 < x < 0.10)

Note: F_{st} = Wright's genetic differentiation index. G_{st}' = Hendrick's F_{st} analogous. D_{est} = Jost's genetic differentiation index.

Values between parentheses indicate the confidence interval obtained through 1,000 replications with bootstrap method.

3.6 | Genetic and breeding management of the ex situ *B. insularis* population

We recovered a mean kinship value of 0.20 for the captive population based on the weighted average of the mean relatedness values from the 34 alive individuals (Appendix S6). Furthermore, the genetic data allowed the two cases of uncertain paternity and uncertain maternity to be resolved. Due to the decrease of the putative father ID0001 and absence of any tissue for accessing any genetic information, we were not able to test his paternity. Then, paternity analyses were only conducted using the possible father ID011F, revealing relatedness values (R) equal to zero among this possible father and the three offspring (ID06FF, ID08FF, and ID09FF; Table 3; Appendix S7), excluding this possible parentage. Maternity analyses revealed a founder female as mother for each offspring (Table 3; Appendix S7): mother ID0009 to the offspring ID011F, mother ID0010 to the offspring ID013F, mother ID0010 to the offspring ID014F, mother ID0006 to the offspring ID015F, and mother ID0013 to the offspring ID021F. Individuals ID06FF, ID013F, and ID021F were excluded from Appendix S6, given that they are dead, therefore unable to contribute as relatives to the next generations. After addressing these uncertain parental relationships, a pedigree of the ex situ population was drawn, assembling these data with the previous breeding information (Appendix S7).

Aiming to improve the genetic contribution of each founder, and to avoid inbreeding, six preferential couples are suggested (Table 4).

4 | DISCUSSION

Conservation studies and efforts have been predominantly focused on endangered species (McLennan et al., 2018; Reynolds et al., 2015; Rodriguez et al., 2012). Accordingly, this study is a

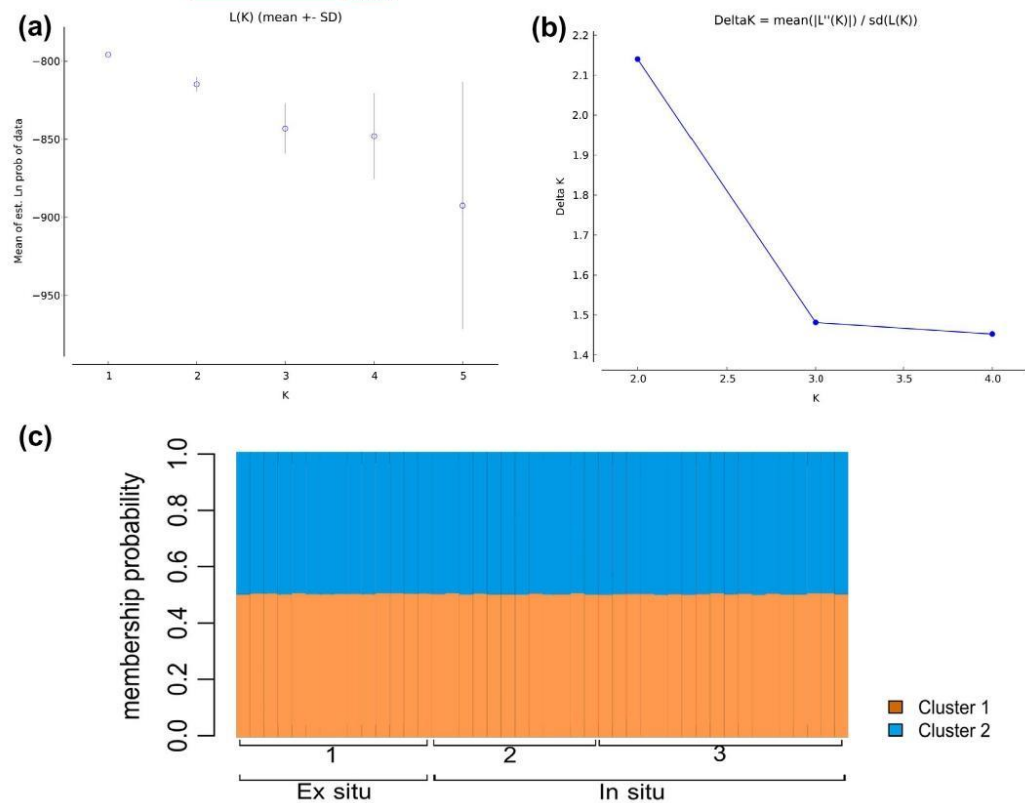


FIGURE 3 Genetic structure of *Bothrops insularis* using 11 microsatellite loci and the STRUCTURE software. (a) Graphic of the likelihood as a function of K (Prob (Ln) K) Method; best: $K = 1$. (b) Graphic of the ΔK for *B. insularis* (Evanno method; best $K = 2$). (c) Bar plot showing the membership probability of each individual to belong to each genetic cluster ($K = 2$).

contribution to the conservation program of *B. insularis*, a critically endangered Brazilian snake, for which we describe the first genetic diversity framework of a wild and a captive population. Genetic parameters presented herein are required by the National Conservation Plan of Insular Herpetofauna (Bataus et al., 2011) and should guide the delimitation of conservation strategies. Besides the fact that the species is included in Brazilian conservation plans, *B. insularis* should be conserved because of: (a) its diversification process and phylogenetic relationships within the *B. jararaca* group (Alencar et al., 2016; Grazziotin et al., 2006; Hamdan et al., 2020); (b) the uniqueness of ecological and reproductive traits, such as its diet based on birds as adults and the hemipenis in females (Hoge et al., 1953; Marques et al., 2012; Martins et al., 2002), its unique venom which toxicity changes ontogenetically and is higher upon birds than mammals (Zelanis et al., 2008), and the possibility of using this species as a model for evolutionary and ecological studies (Duarte et al., 1995).

4.1 | Population genetics of *B. insularis*

Heterologous amplification is a tool widely used in studies of conservation genetics. The success of heterologous amplifications is higher in closely related species relative to distant species (Blouin-Dermers & Gibbs, 2003; Mattson et al., 2007; Simonov & Wink, 2011). A high rate of heterologous amplification was expected in this study given that *B. insularis* is included in the *B. jararaca* complex, which is the sister group to the *B. neuwiedi* complex (Carrasco et al., 2012). We recorded a success rate of 59.3% heterologous amplification, in which *B. mattogrossensis* microsatellite loci performed better than *B. pauloensis* and *B. marmoratus* loci. This evinces the efficacy of such markers when studying populations within the *B. jararaca* complex, despite not being specific to this group.

Isolated, small, and critically endangered populations tend to present low values of genetic diversity and inbreeding occurrence relative to continental or unthreatened populations (Allendorf

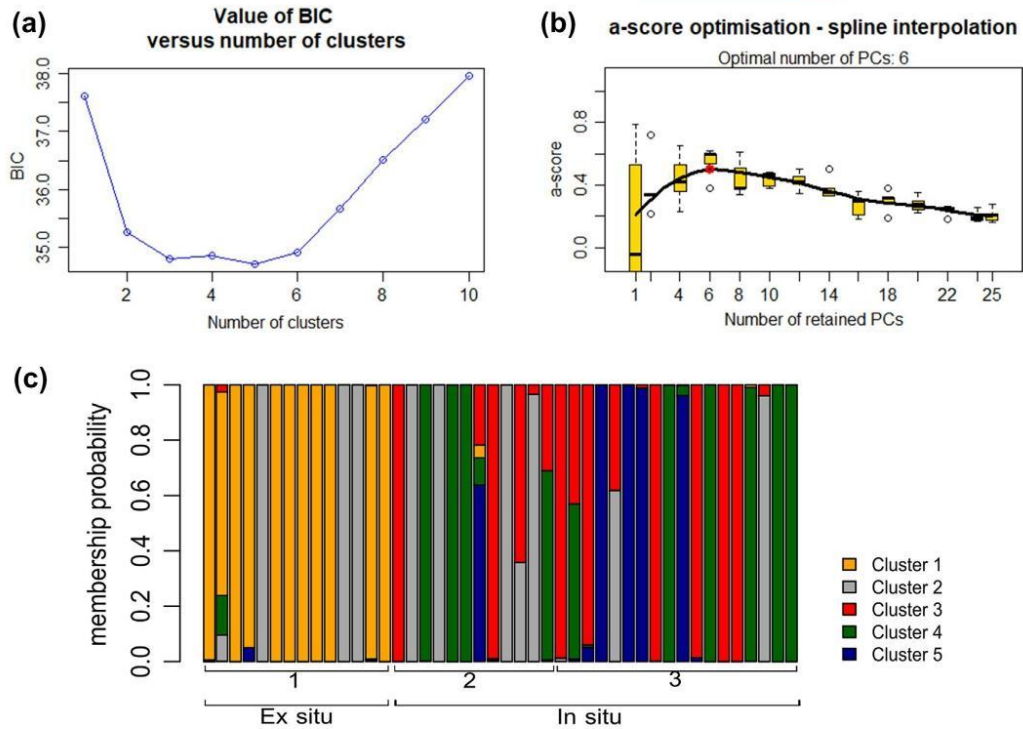


FIGURE 4 Genetic structure of *Bothrops insularis* using 11 microsatellite loci and the Discriminant Analysis of Principal Components. (a) Graphic of the Bayesian Information Criterion (BIC) as a function of K (best: $K = 5$). (b) Graphic of the α -score as a function of number of Principal Components (PC; best: 6 PCs). (c) Bar plot showing the membership probability of each individual to belong to each genetic cluster ($K = 5$). Note the existence of one cluster exclusive to the ex situ population (yellow) and the absence of correlation of the sampling location and clusters obtained in the in situ population (red, green, blue, and gray).

TABLE 3 Parentage analyses of offspring with uncertain paternity and unknown mother; p -values obtained through the ML Related analyses

Putative Parent	Offspring							
	ID06FF	ID08FF	ID09FF	ID011F	ID013F	ID014F	ID015F	ID021F
ID011F	1.000	0.170	0.687	-	-	-	-	-
ID0003	-	-	-	0.169	0.108	0.123	0.065	0.073
ID0005	-	-	-	0.186	0.318	0.629	0.192	0.188
ID0006	-	-	-	1.000	0.043	0.110	0.054 ^a	0.125
ID0007	-	-	-	0.190	1.000	0.138	1.000	1.000
ID0008	-	-	-	0.195	1.000	1.000	1.000	0.200
ID0009	-	-	-	0.146 ^a	0.966	0.177	0.639	0.179
ID0010	-	-	-	0.728	0.026 ^a	0.024 ^a	0.147	0.173
ID0011	-	-	-	0.653	1.000	0.968	0.810	0.814
ID0012	-	-	-	0.900	1.000	1.000	0.104	0.049
ID0013	-	-	-	0.881	1.000	1.000	0.097	0.046 ^a

^aRepresentatives with the major probability of maternal relationship with offspring.

TABLE 4 List of suggested breeding couples based on microsatellite data

Male	Mean kinship	Female	Mean kinship	R
ID0018	0.25	ID0007	0.17	.06
ID0017	0.15	ID014F	0.11	0
ID009F	0.12	ID001F	0.18	0
ID27FF	0.18	ID09FF	0.14	.06
ID11FF	0.12	ID03FF	0.19	0
ID19FF	0.17	ID08FF	0.13	0

Note: R = Relatedness index value between each pair of representatives.

et al., 2013; Frankham et al., 2008). Considering the number of alleles and the heterozygosity rates, genetic diversity in each population was low compared with *B. newiedi* group species (*B. marmoratus*, *B. mattogrossensis*, and *B. pauloensis*; Machado, 2015) and other continental species (Duan et al., 2017; King, 2009). Low genetic diversity was also recovered in other critically endangered snakes (Jaeger et al., 2016; King, 2009; Meister et al., 2012; Wang et al., 2015); heterozygosity values found herein were similar to the ones compiled by King (2009) for snake species (0.35–0.87/ average: 0.60). The exception is the locus Bmat_080, which show the lowest rates of heterozygosity (ex situ: 0.09; in situ: 0.03–0.13), possibly as a consequence of a fixation process of the allele "193" (Appendix S5).

The higher rates of observed heterozygosity in comparison with the expected heterozygosity might be explained by the association of demographic events and the genetic diversity. Founder effects and bottlenecks are known to be the phenomena responsible for the reduction of the genetic diversity of populations, leading to a reduction in the number of alleles and heterozygosity (Piry et al., 1999). However, reduction in the number of alleles is faster than the decrease in heterozygosity rates, so that in some cases observed heterozygosity rates may be higher than the expected ones, which are based on the allele frequencies (King, 2009; Luikart & Cornuet, 1998). It might be considered that populational growth after a bottleneck event may increase heterozygosity rates (Allendorf et al., 2013). Demographic history records of *B. insularis* indicate that the in situ population declined in the past 20 years due to bushfires and anthropogenic actions. The last populational census recovered a high density and stability in the in situ population, with records of growth rates (Guimarães et al., 2014). Therefore, even though our results did not recover evidences of a recent bottleneck, we may hypothesize that the heterozygosity rates obtained herein might be explained by the existence of bottleneck effect during the last two decades (or the founder effect in the ex situ population) associated with demographic growth in both populations during the last years.

We recovered a significant negative value of inbreeding mating system coefficient for both ex situ and in situ populations. These results contradict the tendency for positive inbreeding values observed in snakes (see King, 2009). Though the analyses indicate that outbreeding is the mating system in both populations, the in situ population showed a significant positive value of kinship inbreeding

coefficient, suggesting the occurrence of endogamy, which is the mating of related individuals (Allendorf et al., 2013). Endogamy was also reported in another endemic insular snake, *Gloydus shedaensis* (Wang et al., 2015). In their study, the authors discuss the possibility that this species evolved dispersal strategies to avoid endogamy. Likewise, we hypothesize that the outbreeding mating system could also have evolved in *B. insularis* as a response to endogamy.

Furthermore, the existence of inbreeding may reduce the genetic fitness in the population, leading, in some cases, to a decline in fecundity and survival rates, as well as sexual abnormalities. Reproductive studies in *B. insularis* have been reported hemipenis in different developmental stages in females (Hoge et al., 1953; Kasperovicz, 2009), small fecundity of this species when compared to its mainland relative *B. jararaca* (Marques et al., 2013), and high level of mutations in males sperm which lead to a reduction in the number of the viable ones (Silva et al., 2015). Therefore, even though we used neutral molecular markers, the data generated herein may be considered an initial step to associate molecular and reproductive data on *B. insularis*.

The genetic divergence between populations could be explained by the existence of private alleles, which, associated with the founder effect of the ex situ population and random sampling of the in situ population, could lead to the low but significant genetic differentiation observed. STRUCTURE results suggest the existence of one population, while DAPC recovered five distinctive genetic clusters with no geographical correlation to the sampling areas. A recent study on the Cascade red fox (*Vulpes vulpes*) also revealed the existence of clusters with no geographic relationship, suggesting family lineages within representatives as a possible explanation. The authors proposed that the mixture of these clusters in the space could indicate the existence of gene flow (Akins et al., 2018). Furthermore, analyses performed in *G. shedaensis* showed the existence of gene flow among subpopulations, with relatives found over a wide geographical spread, allowing these subpopulations to be considered a single conservation unit (Wang et al., 2015). Based on this, although the studies concerned different species with different vagilities, we could hypothesize that there is no structure within the *B. insularis* populations, and the genetic clusters found in DAPC should be related to (a) the isolation of the ex situ population, and (b) existence of recognized families within the wild population due to the low vagility observed (personal observation, Karina Banci). Besides, the gene flow detected based on the pattern distribution of the family lineages suggests that the island might also be considered a single conservation unit.

4.2 | Conservation implications

Although most of the ex situ conservation studies focused only on captive populations, recent researches have highlighted the importance of monitoring in situ populations prior to assessing captive populations, and the integration of both procedures to improve conservation strategies (Castellanos-Morales et al., 2016;

Frankham, 2010; Witzenger & Hochkirch, 2011). Additionally, the so-called sampling address of the founder individuals must be selected in order to minimize inbreeding and outbreeding effects in the ex situ population (Ujvari et al., 2002), taking into account that it should retain 90%–95% genetic similarity to its wild counterpart (Castellanos-Morales et al., 2016; Frankham et al., 2008). We observed a mere 49% of genetic similarity between the in situ and ex situ populations, explained by the low but significant divergence between them due to distinct allelic frequencies. Therefore, we strongly suggest that new individuals from the island should be incorporated into the ex situ population; besides, a breeding protocol (based on genetic and reproductive information) should also be established, in order to choose the ideal couples which may reduce such biases, maintaining the genetic similarity between the populations, as well as avoiding loss of genetic diversity and inbreeding. We also recommend that these data should be associated with ecology and reproductive information guiding future research on this species, so that the genetic data will be used as a base to maintain a healthy and viable captive population, with highly genetically similar to the in situ one, which is crucial for future reintroductions.

Several reproduction and management strategies are proposed to maintain genetic variability and to avoid inbreeding and captive adaptations in the ex situ population. Fernández and Caballero (2001) pointed out that strategies focusing on the reduction of mean kinship among individuals, dampening of the founder effect, or a combination of both strategies are widely used in ex situ conservation programs. Another important issue that must be accounted for is the lack of parentage information for some individuals, which may bias management strategies due to underestimation of kinship and inbreeding within populations (Jiménez-Mena et al., 2015). Our results allowed us to refute a potential relationship between a putative father and three descendants and identify four maternal founders related to five descendants, whose mothers were undetermined. The average kinship value suggests that the ex situ population is composed of half-siblings and representatives with small parentage degree levels (e.g., cousins, uncles, nephews, grandparents), which can be explained by the high genetic contribution of few founders (see Appendix S6). Based on the kinship values and the strategies cited above, we suggest six preferential crosses to the ex situ population (Table 4).

Importantly, a significant inbreeding coefficient was found in the in situ population. Studies have shown that inbreeding is correlated with the fixation of deleterious genes and, when reaching inbreeding depression, results in extinction (Allendorf et al., 2013; Brook et al., 2002; Frankham et al., 2008). Therefore, continuous monitoring of genetic parameters and delimitation of strategies to reduce inbreeding is critical to guarantee the successful conservation of the in situ population, as well as to access genes which may be related to the fitness of this species.

Due to the importance of this species, the Laboratório de Ecologia e Evolução of the Instituto Butantan is developing an interdisciplinary conservation program aiming to implement successful

conservation strategies for this species. So far, researchers' focus was mainly reproduction (sperm viability – Silva et al., 2015; mating season – Marques et al., 2013; Amorim et al., 2019; correlation between diet, development, and sexual maturity – Passos, 2018;) and ecology (diet – Marques et al., 2012; natural history – Marques et al., 2002; populational census – Martins et al., 2008; Guimarães et al., 2014). Our study marked the introduction of genetic studies to guide the management of this species, demonstrating the importance of these parameters to trace conservation strategies, and providing a basis for comparative studies in the future, as well as for the development of conservation efforts. Furthermore, in order to look the hypotheses discussed herein, an integrative study focusing on the home range, dispersal capacity, and correlation of kinship and geographic distance of representatives has been carried out in our laboratory.

It is also worth mentioning that all the information generated herein should provide the base of the development and implementation of the conservation center of the Instituto Butantan' Zoo Park.

5 | CONCLUSIONS

Bothrops insularis showed levels of genetic diversity similar to those expected for insular, small, and isolated populations. Genetic differentiation between both in situ and ex situ populations could be related to genetic drift, founder effect, and sampling gaps in the ex situ population foundation. Though the inbreeding coefficient was only significant in the in situ population, the screen of this parameter is crucial to any conservation strategy for this species. Overall, to improve the management of the in situ and ex situ populations, we suggest the following: (a) screening the loss of genetic diversity in the ex situ populations; (b) incorporating new representatives from in situ population as a method to improve genetic diversity and maintain genetic homogeneity between populations; (c) following preferential breeding pairs to avoid inbreeding and to guarantee equal genetic contribution of all founders; and (d) analyze possible impacts of outbreeding if translocations and reintroductions are established as conservation purposes of the ex situ population. In sum, this study is a preliminary contribution to the conservation program of *B. insularis* and might be used as initial mark for comparative in future genetic assessments, as well as in studies with ecology and reproduction for this and related species.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 2014/02558-2 MJJS; 2017/04774-1 ISO; 2012/07334-9 OAVM), Fundação Butantan (Publication and english review fees), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 202686/2013-2 TM), and Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CEFOP – SUS – SP). We thank Dr. Márcio Martins for the topographic map of the island. We also thank Bruno M. Costa, Felipe C. B. Calvacanti, Juliana

Passos, Kalena Barros da Silva, Kelly Kish, Leonardo S. Kobashi, and Mrs. Maria M. Vendramini for technical assistance and information. Lastly, we are grateful to anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions on the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have knowledge about the content within this manuscript and declare the absence of conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

Igor Salles-Oliveira: Conceptualization (equal); Data curation (lead); Formal analysis (lead); Investigation (equal); Methodology (lead); Validation (lead); Visualization (equal); Writing-original draft (lead); Writing-review & editing (lead). **Tais Machado:** Data curation (supporting); Formal analysis (supporting); Methodology (supporting); Writing-original draft (supporting); Writing-review & editing (supporting). **Karina Banci:** Resources (supporting); Writing-original draft (supporting); Writing-review & editing (supporting). **Selma Maria Almeida-Santos:** Resources (supporting); Writing-review & editing (supporting). **Maria José de J. Silva:** Conceptualization (lead); Data curation (equal); Formal analysis (equal); Funding acquisition (lead); Investigation (supporting); Methodology (supporting); Project administration (lead); Resources (lead); Supervision (lead); Validation (supporting); Visualization (equal); Writing-original draft (supporting); Writing-review & editing (supporting).

ETHICAL APPROVAL

The completion of this project and sample collection were performed under license and authorization of the Ethics Committee on the Use of Animals from Instituto Butantan (CEUAIB – no. 9813/12, CEUAIB – no. 3124270671/17, and CEUAIB – no. 15431705/18).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data underlying this manuscript are available online on Dryad (doi.org/10.5061/dryad.bvq83bk6r). Dataset description: (a) Geographic information of the samplings: Appendix S1, (b) list of the 33 microsatellites tested: Appendix S2, (c) R-script used in the analysis: Appendix S3; (d) Simplified scheme of the methodology: Appendix S4; (e) genotype data obtained from PCR amplification of the 12 loci for the 80 representative samples used herein: Appendix S5; (f) table of the kinship value obtained for each pair of individuals that was alive ($n = 34$): Appendix S6, (g) pedigree from the ex situ population of *B. insularis* housed at the Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, São Paulo state, Brazil: Appendix S7.

ORCID

Igor Salles-Oliveira  <https://orcid.org/0000-0003-4251-1725>

Tais Machado  <https://orcid.org/0000-0002-2791-8968>

Karina Banci  <https://orcid.org/0000-0003-4891-3768>

Selma M. Almeida-Santos  <https://orcid.org/0000-0002-3928-1183>

<https://orcid.org/0000-0002-3928-1183>

Maria José de J. Silva  <https://orcid.org/0000-0002-0841-8677>

REFERENCES

- Akins, J. R., Aubry, K. B., & Sacks, B. N. (2018). Genetic integrity, diversity and population structure of the Cascade red fox. *Conservation Genetics*, 19, 969–980.
- Alencar L. R. V., Quental T. B., Graziotin F. G., Alfaro M. L., Martins M., Venzon M., ... Zaher H. (2016). Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 50–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.029>.
- Allendorf, F. W., Luikart, G., & Aitken, S. N. (2013). *Conservation and the genetic of populations* (2nd ed., p. 602). Wiley-Blackwell.
- Amorim, L. G. S., Azevedo, C. R., Azevedo, W. S., & Almeida-Santos, S. M. (2019). First record of mating of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) in nature, with comments on sexual behaviour. *Herpetology Notes*, 12, 225–227.
- Arruda, M. P., Costa, W. P., & Recco-Pimentel, S. M. (2017). Genetic diversity of Morato's Digger Toad, *Proceratophrys morato*: Spatial structure, gene flow, effective size and need for differential management strategies of populations. *Genetic and Molecular Biology*, 40(2), 502–514.
- AZA (2020). Species survival plan programs. <https://www.aza.org/species-survival-plan-programs>. Accessed in 19/09/2020.
- Bataus, Y., Reis, L. M., Hudson, A., Brasileiro, C., Campos, F., Pinto, H., Amaral, I., Becker, J. H., Lima, L., Guaraldo, K., Straoazzom, S., Pentado, M., Marques, O., Magris, R., Sawaya, R., Zacariotti, R., & Lima, W. (2011). *Plano de ação nacional para a conservação da herpetofauna insular ameaçada de extinção* (p. 124). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (LEMBIO).
- Blouin-Dermers, G., & Gibbs, H. L. (2003). Isolation and characterization of microsatellite loci in the black rat snake (*Elaphe obsoleta*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 98–99.
- Brasil (1985). Decreto nº 91.887, de 5 de Novembro de 1985. Diário Oficial da União, 15 nov. 1985, Seção 1, p. 16187.
- Brook, B. W., Tonkyn, D. W., O'Grady, J. J., & Frankham, R. (2002). Contributing of inbreeding to extinction risk in threatened species. *Conservation Ecology*, 6(1), 16.
- Campbell, J. A., & Lamar, W. W. (2004). *The venomous reptiles of western hemisphere* (Vol. 1, 1st ed, p. 476). : Cornell University Press.
- Carrasco, P. A., Mattoni, C. L., Leynaud, G. C., & Scrocchi, G. J. (2012). Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, 41(2), 109–124.
- Castellanos-Morales, G., Gutiérrez-Guerrero, Y. T., Gámez, N., & Eguiarte, L. E. (2016). Use of molecular and environmental analyses for integrated in situ and ex situ conservation: The case of the Mexican prairie dog. *Biological Conservation*, 204, 284–295.
- Duan, Y., Wang, Y., Bai, S., Tian, X., Rong, K., & Ma, J. (2017). Genetic diversity and population genetic structure of *Python bivittatus* in China. *Journal of Forest Research*, 28(3), 651–658.
- Duarte, M. R., Puerto, G., & Franco, F. L. (1995). A biological survey of the pitviper *Bothrops insularis* Amaral (Serpentes, Viperidae): An endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 30(1), 1–13.
- Dutra, N. C. L., Telles, M. P. C., Dutra, D. L., & Silva Júnior, N. J. (2008). Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 in Central Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 603–613.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of cluster of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.

- Fernández, J., & Caballero, A. (2001). A comparison of management strategies for conservation with regard to population fitness. *Conservation Genetics*, 2, 121–131.
- Frankham, R. (2005). Genetics and Extinction. *Biological Conservation*, 126, 131–140.
- Frankham, R. (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, 143, 1919–1927.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2008). *Fundamentos de genética da conservação* (1st ed., p. 262). Sociedade Brasileira de Genética.
- Gallego-García, N., Vargas-Ramírez, M., Forero-Medina, G., & Caballero, S. (2018). Genetic evidence of fragmented populations and inbreeding in the Colombian endemic Dahl's toad-headed turtle (*Mesoclemmys dahl*). *Conservation Genetics*, 19, 221–233.
- Goudet, J. (2002). *FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices*, ver. 2.9.3.2.
- Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184–186.
- Grazziotin, F. G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., & Bonatto, S. L. (2006). Phylogeography of *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15, 3969–3982.
- Guimarães, M., Mungula-Steyer, R., Doherty, P. F., Martins, M., & Sawaya, R. J. (2014). Population dynamic of the critically endangered golden lancehead pitviper, *Bothrops insularis*: Stability or Decline? *PLoS One*, 9(4), e95203.
- Hamdan, B., Guedes, T. B., Carrasco, P. A., & Melville, J. (2020). A complex biogeographic history of diversification in Neotropical lancehead pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, 49, 145–158.
- Hedrick, P. W., Robinson, J. Á., Peterson, R. O., & Vucetich, J. A. (2019). Genetics and extinction and the examples of Isle Royale wolves. *Animal Conservation*, 22, 302–309.
- Hoge, A., Belluomini, H., & Schreiber, G. (1953). Intersexuality in a highly isolated population of snakes. *Atti del IX Congresso Internazionale di Genetica. Caryologia*, 1, 964–965.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2018a). *Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção* (1st ed.). ICMBio/MMA.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2018b). *Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: Volume IV – Répteis* (1st ed.). ICMBio/MMA.
- IUCN – International Union for Conservation of Nature (2019). *IUCN Red List of Threatened Species – Bothrops insularis (Golden lancehead, Queimada Grande Island, Bothrops)*. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/details/2917/0>
- IUCN (2002). *IUCN Technical Guidelines on the Management of Ex-situ Populations for Conservation*. <https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/Rep-2002-017.pdf>. Accessed in 19/ 09/ 2020.
- Jaeger, C. P., Duvall, M. R., Swanson, B. J., Phillips, C. A., Dreslik, M. J., Baker, S. J., & King, R. B. (2016). Microsatellite and major histocompatibility complex variation in an endangered rattlesnake, the Eastern Massasauga (*Sistrurus catenatus*). *Ecology and Evolution*, 1–13.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.
- Janes, J. K., Miller, J. M., Dupuis, J. R., Malenfant, R. M., Gorrell, J. C., Cullingham, C. I., & Andrew, R. L. (2017). The K=2 conundrum. *Molecular Ecology*, 26(14), 3594–3602. <https://doi.org/10.1111/mec.14187>
- Jiménez-Mena, B., Schad, K., Hanna, N., & Lacy, R. C. (2015). Pedigree analysis for the genetic management of group-living species. *Ecology and Evolution*, 6(10), 3067–3078.
- Jombart, T. (2008). ADEGENET: A R package for multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405.
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BioMed Central Genetics*, 11(94), 1–15.
- Kaerse, M., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ML-Relate: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6, 576–579.
- Kamvar, Z. N., Brooks, J. C., & Grunwald, N. J. (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontier in Genetics*, 6(208), 1–10.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grunwald, N. J. (2014). Poppr: A R package for genetic analysis of population with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2(281), 1–14.
- Kasperoviczus, K. N. (2009). *Biologia reprodutiva da jararaca ilha, Bothrops insularis (Serpentes: Viperidae), da Ilha da Queimada Grande*. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 126.
- Kasperoviczus, K. N., & Almeida-Santos, S. M. (2012). Instituto Butantan e a jararaca-ilhoa: cem anos de história, mitos e ciência. *Cadernos De História Da Ciências – Instituto Butantan*, 8(2), 255–269.
- King, R. B. (2009). Population and conservation genetics. In: S. J. Mullin, & R. A. Siegel (Eds.), *Snakes: Ecology and conservation* (1st ed., pp. 78–122). Cornell University.
- Lukart, G., & Cornuet, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked population from alleles frequency data. *Conservation Biology*, 12(1), 228–237.
- Machado, T. (2015). *Filogenia e Filogeografia do grupo Bothrops neuwiedi (Serpentes, Squamata)*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 184.
- Madsen, T., Olsson, M., Wittzell, H., Stille, B., Gullberg, A., Shine, R., Andersson, S., & Tegelström, H. (2000). Population size and genetic diversity in sand lizards (*Lacerta agilis*) and adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation*, 94, 257–262.
- Marques, O. A. V., Kasperoviczus, K., & Almeida-Santos, S. M. (2013). Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, southeast Brazil. *Journal of Herpetology*, 47(3), 393–399.
- Marques, O. A. V., Martins, M., Develley, P. F., Macarrão, A., & Sazima, I. (2012). The golden lancehead *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) relies on two seasonally plentiful bird species visiting its island habitat. *Journal of Natural History*, 46(13–14), 885–895.
- Marques, O. A. V., Martins, M., & Sazima, I. (2002). A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). *Herpetologica*, 58(3), 303–312.
- Martins, M., Sawaya, J., & Marques, O. A. V. (2002). Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: W. Schuett, M. Höggren, M. E. Douglas, & H. W. Greene (Eds.), *Biology of the vipers* (1st ed., pp. 307–328). Eagle Mountain Publishing.
- Martins, M., Sawaya, J., & Marques, O. A. V. (2008). A first estimate of the population size of the critically endangered lancehead, *Bothrops insularis*. *South American Journal of Herpetology*, 3(2), 168–174.
- Mattson, K. J., De Vries, A., McGuire, S. M., Krebs, J., Louis, E. E., & Loskutoff, N. M. (2007). Successful artificial insemination in the corn snake *Elaphe guttata* using fresh and cooled semen. *Zoo Biology*, 26, 363–369.
- McAliley, L. R., Willis, R. E., Ivanyi, C., & Densmore, L. D. III (2016). Captive breeding of the endangered San Esteban Chuckwalla, *Sauromalus*

- varius*: Effects of a decade of captive breeding on maintaining genetic diversity. *The Southwestern Naturalist*, 61(4), 279–285.
- McLennan, E. A., Gooley, R. M., Wise, P., Below, K., Hoog, C. J., & Grueber, C. E. (2018). Pedigree reconstruction using molecular data reveals an early warning sign of gene diversity loss in an island population of Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*). *Conservation Genetics*, 19, 439–450.
- Meirmans, P. G., & Hedrick, P. W. (2011). Assessing population structure: F_{st} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11, 5–18.
- Meister, B., Ursenbacher, S., & Baur, B. (2012). Grass snake population differentiation over different geographic scales. *Herpetologica*, 68(1), 134–145.
- Michaelidis, S., Cole, N., & Funk, S. M. (2015). Translocations retains genetic diversity of a threatened endemic reptile in Mauritius. *Conservation Genetics*, 16, 661–672.
- Monzón-Argüello, C., Patiño-Martínez, C., Christiansen, F., Gallo-Barneto, R., Cabrera-Pérez, M., Penã-Estévez, M. A., López-Jurado, L. F., & Lee, P. L. M. (2015). Snakes on an island: Independent introductions have different potentials for invasion. *Conservation Genetics*, 16, 1225–1241.
- Navega-Gonçalves, M. E. C., & Porto, T. (2016). Snake Conservation in Brazilian Biomes. *Bioikos*, 30(1), 55–76.
- Paradis, E. (2010). Pegas: A R package for population genetics with an integrated – modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419–420.
- Passos, J. (2018). *Influência no crescimento de Bothrops insularis e Bothrops jararaca: A dieta pode interferir no tamanho da maturidade sexual em cativeiro?* Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 66 p.
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity*, 90(4), 502–503.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carraedo, A., & Lareu, M. V. (2013). An overview of STRUCTURE: Applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4, 98. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0.
- Reynolds, R. G., Puente-Rolón, A. R., Platenberg, R., Tyler, R. K., Tolson, P. J., & Revell, L. J. (2015). Large divergence and low diversity suggest genetically informed conservation strategies for the endangered Virgin Islands Boa (*Chilabothrus monensis*). *Global Ecology and Conservation*, 3, 487–502.
- Rice, W. T. (1989). Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223–225.
- Rodrigues, M. T. (2005). The conservation of Brazilian reptiles: Challenges for a megadiverse country. *Conservation Biology*, 19(3), 659–664.
- Rodríguez, D., Forstner, M. R. J., McBride, D. L., Densmore, L. D. III, & Dixon, J. R. (2012). Low genetic diversity and evidence of population structure among subspecies of *Nerodia harteri*, a threatened water snake endemic to Texas. *Conservation Genetics*, 13, 977–986.
- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Shafer, A. B. A., Wolf, J. B. W., Alves, P. C., Bergström, L., Bruford, M. W., Brännström, I., ... Zieliński, P. (2015). Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends in Ecology & Evolution*, 30, (2), 78–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.009>.
- Silva, K. B., Zogno, M. A., Camillo, A. B., Pereira, R. J. G., & Almeida-Santos, S. M. (2015). Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. *Animal Reproduction Science*, 163, 144–150.
- Simonov, E., & Wink, M. (2011). Cross-amplification of microsatellites loci reveals multiple paternity in Hals pitviper (*Gloydius halys*). *Acta Herpetologica*, 6, 289–295.
- Sodhi, N. S., & Ehrlich, P. R. (2010). *Conservation biology for all* (1st ed., p. 358). Oxford University Press.
- Templeton, A. R. (2011). *Genética de populações e teoria microevolutiva* (1st ed., p. 705). : Sociedade Brasileira de Genética – SBG.
- Újvári, B., Madsen, T., Kotsenko, T., Olsson, M., Shine, R., & Wittzell, H. (2002). Low genetic diversity threatens imminent extinction for the Hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosensis*). *Biological Conservation*, 105, 127–130.
- Uetz P., Freed P., Hošek J. (Eds.) (2020). *The reptile database*. <https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/Rep-2002-017.pdf>. Accessed in 19/09/2020.
- VanOosterhout, C., Hutchinson, F. D. W., Wills, D., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correction genotyping errors in microsatellites data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Wallis, G. P. (2019). Thirty years of conservation genetics in New Zealand: What have we learnt? *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 49(3), 320–346. <https://doi.org/10.1080/03036758.2019.1586735>
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biochemical Biotechniques*, 10(4), 506–513.
- Wang, H., Wang, H., Xiao, Y., Wang, X., Sun, L., Shi, J., Lin, A., Feng, J., & Wu, Y. (2015). Low genetic diversity and moderate inbreeding risk of an insular endemic pit viper (*Gloydius shedoensis*): Implication for conservation. *Journal of Herpetology*, 49(2), 190–199.
- Wang, J. (2011). COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analyzing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 141–145.
- West, R., Potter, S., Taggart, D., & Eldridge, M. D. B. (2018). Looking back to go forward: Genetics informs future management of captive and reintroduced populations of the black-footed rock-wallaby *Petrogale lateralis*. *Conservation Genetics*, 19, 235–247.
- Winter, D. J. (2012). Mmod: A R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resource*, 12(6), 1158–1160.
- Witzinger, K. A., & Hochkirch, A. (2011). Ex situ conservation genetics: A review of molecular studies on the genetics consequences of captive breeding programs for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation*, 20, 1843–1861.
- Zelani, A., Travaglia-Cardoso, R. S., & Furtado, M. F. D. (2008). Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. *South American Journal of Herpetology*, 3(1), 43–50.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Salles-Oliveira I, Machado T, Banci KRS, Almeida-Santos SM, Silva MJJ. Genetic variability, management, and conservation implications of the critically endangered Brazilian pitviper *Bothrops insularis*. *Ecol. Evol.* 2020;10:12870–12882. <https://doi.org/10.1002/ece3.6838>

ANEXO 1

Tabela suplementar 9 – Lista dos 33 microssatélites (MACHADO, 2015) testados nesse estudo. Os acrônimos Bmar, Bmat e Bpau se referem aos *primers* obtidos de *B. marmoratus*, *B. matogrossensis* e *B. pauloensis*, respectivamente.

Locos	Forward primer	Reverse primer	Fluoróforos
Bmar_005	TGTA AACGACGGCCAGTGGCAATTCTTAGCCTGCTTG	GTTTAGCCGTTTGTAATGTCCAGC	FAM
Bmar_019	TAATACGACTCACTATAGGGCCACCTCAGCTTTTGTCCAT	GTTTAAACGGGAAGGAAGCAAAGT	VIC
Bmar_027	TGTA AACGACGGCCAGTGAATGTCTTGCCAAATGGGT	GTTTATTGTTGTTGTGAGCCGTCC	FAM
Bmar_030	TAATACGACTCACTATAGGGTGGTTCTAAAGCCTGAGCCA	GTTTAGGCGATGTTGCCAACTAAG	VIC
Bmar_065	GATAACAATTTACACAGGTTTCTATTTCTTTATCTGTCTG	GTTTCCCTGTGTTAAGATAGGCAGC	PET
Bmar_076	TTTCCCAGTCACGACGTTGCAAAATGGTCCACTGAGGGT	GTTTGTCTATCAAGCAAGGTCTCCC	NED
Bmar_078	GATAACAATTTACACAGGCATCTGGTGCGAGCTGTTAG	GTTTGTGTGGTTGACATTGGAGGA	PET
Bmar_079	TGTA AACGACGGCCAGTAAATCTGGCTGGCAGAAGAG	GTTTGCAACACTGGGCATCTAAT	FAM
Bmar_087	GATAACAATTTACACAGGGGGCAGAATTCCCACAAGTA	GTTTAGAAACAAACCAGCCAACTG	PET
Bmar_102	TGTA AACGACGGCCAGTCTCTTTTGCAGTTATGGCCC	GTTTGGCTTAGGAAGACACTGAAA	FAM
Bmar_118	TTTCCCAGTCACGACGTTGTGGATCTGCAAGCTTCATTG	GTTTCCCTTCCCTTCTCCATTCT	NED
Bmat_009	TGTA AACGACGGCCAGTTGTGGTAAGATGAGCAGCCA	GTTTATTCCCGAGTTTCAGTGGTG	FAM
Bmat_010	TAATACGACTCACTATAGGGTCAGAAGGGGAGAAAGGGAT	GTTTACACAAAAGAGGCCTAGCCA	VIC
Bmat_017	TTTCCCAGTCACGACGTTGGAAGACACATAACTTCAGCCA	GTTTCTGTTGAAAGGGAAGGCAAC	NED
Bmat_018	GATAACAATTTACACAGGAGGCAAGCATCTTCAGCACT	GTTTCCCTTCCCTTGTACCAAAAAGTGA	PET
Bmat_049	TGTA AACGACGGCCAGTAGCCAAGCTCACAGATCAAAG	GTTTCATTCCTTTGCCACTCCT	FAM
Bmat_060	TAATACGACTCACTATAGGGAAGAATTGACAACCTTGATAGC	GTTTAGGGGAGACTGAAGCCAATGA	VIC
Bmat_070	TTTCCCAGTCACGACGTTGTGCCTACCGTGACCCTAAAC	GTTTCCCCTGTCTCTGTCTGTGTT	NED
Bmat_080	TGTA AACGACGGCCAGTTCAGTGAAAATGAGTTGGGTG	GTTTGGGCATTGTGACTCAAACCT	FAM
Bmat_081	TAATACGACTCACTATAGGGGCTTTCTGCTCTGCTGGTCT	GTTTGTGACCTTCTCTTCTCCCA	VIC

Continuação Tabela suplementar 9 – Lista dos 33 microssatélites (MACHADO, 2015) testados nesse estudo. Os acrônimos Bmar, Bmat e Bpau se referem aos *primers* obtidos de *B. marmoratus*, *B. mattogrossensis* e *B. pauloensis*, respectivamente.

Locus	Forward primer	Reverse primer	Fluorophore
Bmat_091	TTTCCCAGTCACGACGTTGCCACACTGCTTGACTGAGGA	GTTTGCCCAGGAGGTTAAGGAAAC	NED
Bmat_106	TTTCCCAGTCACGACGTTGGGATCCACTTCATTTCGCCTA	GTTTGGGCTTGCTTGTTCTTCTTG	NED
Bpau_002	TAATACGACTCACTATAGGGGGGAATGTTGGGAACAAGTG	GTTTAGGGGAATTTGTCTCCAGTGC	VIC
Bpau_014	GATAACAATTTACACAGGCATTCCTTTGCCACACTCCT	GTTTACTTGTCAGCCATGCAAGC	PET
Bpau_017	TTTCCCAGTCACGACGTTGAAAGCACATGGCCTCTTCAC	GTTTGAGGTTAAGATTGTGGGGCA	NED
Bpau_059	TTTCCCAGTCACGACGTTGAGCTCAGACGGTACCAAGGA	GTTTCGCTACAGTTGACAGGCAGA	NED
Bpau_074	TTTCCCAGTCACGACGTTGTATCATGGGATTGTCTGGGC	GTTTGATCTGGCCTGGGTTTAAG	NED
Bpau_079	TGTA AACGACGGCCAGTCACAATCTATTT CAGTCCTGCTG	GTTTAATCAGTGGAACAACCTGCC	FAM
Bpau_082	TTTCCCAGTCACGACGTTGCGGAGACCAAAGGTGGTTAC	GTTTGGTGGAAGGAGCCTATG	NED
Bpau_083	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGGTTGTCTTGGTGCCTT	GTTTCACCAGTTTCAGACTTGGAAGA	VIC
Bpau_112	TGTA AACGACGGCCAGTCCACTGCCCCGAATTCTCTAT	GTTTCTCCTCCCAAACCTTCCT	FAM
Bpau_130	GATAACAATTTACACAGGGTAAAATCAGGGTCAGCCCA	GTTTGGAAGGTAACCTTCTGCCCA	PET
Bpau_142	TAATACGACTCACTATAGGGTCTATTGCTGGTCTATGACCGT	GTTTCTGCACCACCATAGCTCTCA	VIC