



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN
GENÉTICA DE *Crocodylus acutus* y
C. moreletii EN MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARTÍN SÁNCHEZ VILCHIS



DIRECTOR DE TESIS:
DR. VICTOR HUGO REYNOSO ROSALES

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Sánchez Vilchis Martín 56 06 06 90 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 400052915</p>
<p>2. Datos del tutor Dr Victor Hugo Reynoso Rosales</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Daniel Piñero Dalmau</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Mark Earl Olson</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M en C Luis Ramos Tavera</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Biol Alejandra Vázquez Lobo</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Variación genética de <i>Crocodylus acutus</i> y <i>C. moreletii</i> en México 82 p 2007</p>

DEDICO ESTE TRABAJO

**A mi mamá, mi papá,
mi hermano, mi abue
y al gran recuerdo
que tengo de ella.**

**Saving the biota of the Earth will require greater efforts
to preserve not only the patterns of biodiversity
but also the processes that generate and maintain it**

Smith, Kark, Schneider, Wayne y Moritz
(Trends in Ecology and Evolution, 2001-16(8):431)



Dibujantes: Edalí Gutiérrez y Sofía Gómez Ezeta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso por todo el apoyo durante el tiempo que estuve haciendo mi tesis y por el que me sigue brindando.

A la Biol. Alejandra Vázquez Lobo Yurén, mi maestra y sinodal por su apoyo y por sacarme de los grandes atolladeros mentales.

A la M. en C. Laura Márquez, por ayudarme en todo lo que al laboratorio se refiere, por ser tan buena persona y porque sin ella el laboratorio de molecular no sería lo que es: el orgullo del Instituto de Biología.

Al Dr. Mark Earl. Olson por todas las asesoría, por enseñarme a redactar, por las discusiones que le dieron claridad a mi trabajo, por prestarme su Mac y por tener el mejor laboratorio del Instituto de Biología.

Al Dr. Daniel Piñero Dalmau por las sugerencias que le dieron un gran sentido a mi trabajo.

Al M. en C. Luis Ramos Tavera por las observaciones hechas al presente trabajo.

Al Dr. Felipe Vilchis Uribe, mi tío e importante guía en este proceso.

A la M. en C. Ana Laura (algodoncito) Wegier por la gran asesoría y ayuda en la parte de anidación de clados.

Al Dr. David Ray y colaboradores por proporcionar información de las localidades muestreadas en su trabajo, constituir una excelente base para el comienzo y desarrollo del presente trabajo.

Al M. en C. Eleazar Loa Loza, mi *master* en el manejo cocodrilos y colecta de muestras. Al Biol. Jerónimo Domínguez Laso por proporcionar las muestras del Cañón del Sumidero.

A los chavos que están haciendo sus tesis en el Instituto de Biología: Julieta por una excelente amistad y por echarme tantas porras, Ruby, Liz, Norbert, Angie, Lauriux, Vanessa, Tania, Ruthy, Juan Carlos y Elsa por la gran ayuda que han sido. A toda la banda del labo C-216, en especial a José, Euge, Robert y Elisa “la china”. A Denisilla, mil gracias por todo el apoyo y por esta gran amistad.

A los que ayudaron en la colecta de muestras y manejo de cocodrilos: José Manuel Galindo, Raúl, Carlos Aguirre, Wendy; a la gente de “Casa del Agua” en Pantanos de

Centla, Tabasco; al parque zoológico la Venta; al Biol. Marco A. López Luna y los chavos de la UJAT; al personal del campamento tortuguero de Puerto Arista, Chiapas; a la gente de Ventanilla, Oaxaca, especialmente a Nacho y Tino; a Rocío y Teresa.

A mi familia: mi papá Marco, mi mamá Mechis, mi hermano Pepe y a mi abue “La Sra. Huerta”, por todo el amor y apoyo que me han dado.

A mis primos que sin ellos no sería quien soy: Rudy, Xime, Cucho, Virgilio, Jairo, Tobías, Pacha, Pato, Paloma, Tato, Alon, Andrea, Chavo, Diego, Vale, Pollo, Iris, Esme, Emmita mi ahijada, Abraham-Polo también por ayudarme en la traducción de la clave del GeoDis, Aarón, Leo, Anita, José Angel JR., Analí, Beto, Erick y Tavo.

A mis sobrinos que quiero tanto: Pite, Baty, Pelu, Santiago y Pablito.

A mis tías que son el motor de la familia y que fueron quienes me formaron: Emmy, Mi tía Mary, Tobe, Mi madrin Lucy, Mamá Viky, mi tía Lidia, Berthis, Hilda mi comadre, Delis y Chio.

A mis tíos Joe, Martín, Abrahamis, Mi tío Rudy, Chaparrito, Valero y Horacio.

A mis compadres Erika y Pedro, a sus hermosas hijas Valentina y Sofía mi ahijada por su gran amistad.

A todos mis amigos, especialmente a Pablo, Geli, Ximena Ezeta, Crispix, Vero, Liliana Torres, Fabiola Villela, Ana Quan Kiu, Wolke, Karla, Andreix, Natalia, Citlalli, Fabricio, Morena, Luciana, Bernardo, Clariux, Eleonora, Miguel-vicios, Conrrado, Michele, Lalo, Mariana Abarca, Alicia, Jerónimo, Mariel, Cecilia, Chucho, Dan, Gaby y Challos, Cinthya mi amiga desde el Cámbrico, Alba, Maga, Octavio, Carmen, Eric G., Fernando el tabas, Lui, Blanshi, William, Victor el amarillín, Anita Evanisi, Argelia, Otaku, Ayami y toda la banda que omití pero que saben que siempre están en mi corazón y en mi pensamiento, me siento afortunado por tenerlos a mi lado, mil gracias. A la hermosa Ana Alí por todo su apoyo, cariño y amor.

A todos mis maestros y los que han colaborado para que este trabajo llevara a cabo y que me han inspirado en este capítulo de mi vida que se cierra para dar paso al siguiente.

La secuenciación fue parcialmente financiada por el proyecto PAPIIT IN 222506 DGAPA, UNAM a cargo del Dr. Víctor Hugo Reynoso. El Instituto de Biología de la UNAM por la compra de algunos reactivos y por parte del financiamiento del presente trabajo.

Reflexión

Un llamado a la sensibilización es necesario para este trabajo. Recientes acontecimientos, que tuvieron lugar en Tomatlán, Jalisco donde un cocodrilo arrebató de las manos de su madre a un niño de 5 años de edad. Los locales toman represalias en contra de los cocodrilos refiriéndose a ellos individualmente como “El asesino” (La Jornada, mayo de 2007).

Las autoridades de SEMARNAT hablan muy a la ligera y se mueven cocodrilos de un estero a otro sin tener pleno conocimiento de las consecuencias genéticas o de transmisión de enfermedades, entre otras. Se deben adoptar políticas y actitudes para coexistir con los cocodrilos, como lo hemos hecho con otras especies. Si no se hace algo, el hombre puede ir desplazando a los demás organismos, perdiendo así la riqueza verdadera que se encuentra en la diversidad a todos los niveles, desde el genético hasta el paisajístico. Los seres humanos irán desplazándose como lo han hecho hasta ahora, tomando solo lo que creen “bueno” y lo que “necesitan”, dejando atrás un listado de especies que no existen más.

El presente trabajo hace un llamado a la reflexión y al más mínimo sentido común, para tomar en cuenta a los demás seres vivos que coexisten en la Biósfera. Los seres humanos constituimos solo una especie más de las millones que habitamos el planeta, en realidad no somos dueños de ninguna de las especies que cohabitan con nosotros. Necesitamos de todas y cada una de las demás especies para seguir existiendo. Debemos hacer esfuerzos importantes para que el verdadero valor de todos los organismos, incluidos los tres dominios (Arqueobacterias, Eubacterias y Eucarionte) que constituyen el total de los seres vivos, sea tomado en cuenta por la especie humana. Los procesos ecológicos actuales son la base de los procesos evolutivos, hagámoslos respetar para poder seguir existiendo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 La variación genética.....	4
1.2 Los cocodrilos de México.....	4
1.3 Objetivo general.....	7
1.4 Objetivos particular.....	7
1.5 Preguntas de investigación.....	7
1.6 Hipótesis.....	8
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1 Caracteres moleculares.....	9
2.2 DNA mitocondrial.....	11
2.3 Los haplotipos.....	12
2.4 Trabajos sobre DNA mitocondrial.....	13
2.5 Un poco de historia.....	14
2.6 Las dos especies.....	16
2.7 Las especies simpátridas y sus conflictos.....	18
2.8 La hibridación.....	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
3.1 Sitios de colecta.....	21
3.2 Trabajo de campo	23
3.3 Trabajo de laboratorio.....	23
3.4 Extracción de DNA.....	23
3.5 Gel de agarosa al 1%.....	24
3.6 PCR y secuenciación.....	25
3.7 Revisión de secuencias con distribución simpátrida.....	27
3.8 Evaluación de la diversidad genética.....	29
3.9 Revisión de muestras con distribución simpátrica.....	29
3.10 Redes de haplotipos y su correspondencia geográfica.....	30

3.11 Análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA).....	30
4. RESULTADOS.....	34
4.1 DNA templado.....	34
4.2 Amplificados	34
4.3 Variación genética.....	35
4.4 Diversidad genética.....	37
4.5 Relaciones de distancia.....	38
4.6 Relaciones haplotípicas y su distribución geográfica.....	40
4.6.1 Relación <i>C. moreletii</i>	40
4.6.2 Relación <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i>	43
4.6.3 Relación <i>C. acutus</i> y tipo- <i>C. acutus</i>	45
4.7 Anidación de clados, relación <i>C. acutus</i> , <i>C. moreletii</i> y tipo- <i>C. acutus</i>	46
5. DISCUSIÓN.....	50
5.1 Diversidad nucleotídica y haplotípica.....	51
5.2 Distancia genética	53
5.3 Variación haplotípica y correspondencia con la geografía	54
5.4 Patrones históricos de <i>Crocodylus</i> en México a partir de NCPA	56
5.5 La naturaleza del mtDNA para evaluar hibridación y las poblaciones puras	59
6. CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	64
APÉNDICE A.....	74
APÉNDICE B.....	76

RESUMEN

Se analizó la variación genética que presentan *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* a lo largo de su distribución en México. Se tomaron muestras de 13 localidades para *C. acutus* y ocho localidades para *C. moreletii*. La extracción de DNA se hizo a partir de sangre, la amplificación por PCR, y secuenciación de 548 pares de bases correspondieron a la primera mitad de la región control de la mitocondria (RCmt), para generar un total de 59 secuencias, 35 de *C. acutus* y 24 de *C. moreletii*. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias del GenBank de Guatemala y Belice, en las que se detectó un número mayor de transversiones que de transiciones. Se observó un bajo nivel de diversidad haplotípica y nucleotídica para *C. acutus* ($h = 0.1079 \pm 0.0680$, $\pi = 0.000200 \pm 0.000372$) y *C. moreletii* ($h = 0.4094 \pm 0.1035$, $\pi = 0.002078 \pm 0.001558$) a lo largo de su distribución en México. Este bajo nivel de diversidad puede deberse a que las poblaciones sufrieron un cuello de botella, resultando en una homogeneidad del mtDNA en especies de *Crocodylus*. En total se encontraron dos haplotipos para *C. acutus* y tres para *C. moreletii* en México. Se observó una diferencia de 4.01% entre los haplotipos más frecuentes, propios de cada especie. Se registraron dos haplotipos exclusivos de México, MOR03 para *C. moreletii* y ACU02 para *C. acutus*. *Crocodylus moreletii* muestra una diferenciación significativa en las poblaciones del extremo norte de su distribución en el haplotipo MOR03; se debe buscar si llega más al sur. Doce localidades de las presentadas para *C. acutus* y las ocho localidades de *C. moreletii* presentan haplotipos puros. Se debe poner especial atención en la conservación en estas poblaciones y continuar con su estudio. A partir del NCPA, se encontró que al llegar los cocodrilos a Mesoamérica comenzaron una expansión del área de distribución. Actualmente existe una fragmentación alopátrica para *C. acutus* por lo que se espera una diferenciación importante en el resto de su área de distribución y para *C. moreletii* se observó flujo génico restringido con aislamiento por distancia; confirmando la hipótesis de una diferenciación geográfica entre los distintos haplotipos al aumentar el área de muestreo. En la localidad que alberga las dos especies no se observan evidencias de hibridación, ya que el fenotipo específico coincide con el genotipo. Es necesario realizar un trabajo exclusivamente para caracterizar la hibridación con base en morfología, genética (con marcadores adicionales) y compatibilidad reproductiva. Las dos especies se encuentran perfectamente separadas en México, al menos en las evidencias disponibles. La separación que se corrobora con el análisis de haplotipos y su correspondencia con la geografía.

Palabras clave: haplotipo, DNA mitocondrial, *Crocodylus acutus*, *Crocodylus moreletii*, diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica, filogeografía, hibridación.

ABSTRACT

Genetic variation was analyzed for *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* throughout Mexico. Thirteen localities were evaluated for *C. acutus* and eight for *C. moreletii*. DNA was extracted from blood samples, PCR amplified, and sequences corresponding to the first half of the mitochondrial control region (mtCR), 548 base pairs, were generated for 59 individuals, 35 *C. acutus* and 24 *C. moreletii*. Sequences were compared with others from GenBank of samples from Belize and Guatemala. These sequences showed a higher frequency of transversions than transitions. Low levels of haplotype and nucleotide diversity were observed in samples of *C. acutus* ($h = 0.1079 \pm 0.0680$, $\pi = 0.000200 \pm 0.000372$) and *C. moreletii* ($h = 0.4094 \pm 0.1035$, $\pi = 0.002078 \pm 0.001558$) throughout Mexico. This low level of diversity can be explained by a bottle neck, resulting in homogeneous mtDNA of crocodylian species. Neighbor-joining tree showed that *C. acutus* was well separated from *C. moreletii*, whereas *C. intermedius* was included in the *C. acutus* clade. Two haplotypes were found for *C. acutus* and three for *C. moreletii* in Mexico. The most frequent haplotypes of each species differ by 4.01%. Two haplotypes are unique to Mexico, MOR03 for *C. moreletii* and ACU02 for *C. acutus*. MOR03 of *Crocodylus moreletii* is present in the northernmost part of its distribution, from Tamaulipas to northern Veracruz and its presence farther south must be tested. Twelve localities for *C. acutus* and eight for *C. moreletii* are pure populations. These populations should be conserved and research must continue. NCPA showed that crocodiles started a contiguous range expansion after they arrived to Mesoamerica. In present time *C. acutus* shows an allopathic fragmentation pattern; important genetic differences are expected for its total range. *Crocodylus moreletii* has restricted gene flow with isolation by distance, thus, the hypothesis that an enlargement on the sampled area could reflect a geographic differentiation among haplotypes was confirmed. Both species were present in one locality, but no evidence of hybridization was detected since there is a coherence between genotype and phenotype identification. A study explicitly designed to detect hybridization is urgently needed, aiming to identify the morphology, genetics (with another marker) and crossbreeding compatibility of hybrids. Finally, the trail of haplotypes and geographic patterns shows that both species can be considered as highly distinct, at least based on the available material. The difference was confirmed with geographic and haplotype relationship.

Key words: haplotype, mitochondrial DNA, *Crocodylus acutus*, *Crocodylus moreletii*, nucleotide diversity, haplotype diversity, NCPA, hybridization.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La variación genética

La diversidad biológica resultante de los procesos evolutivos se puede describir a distintos niveles taxonómicos. Se pueden distinguir desde los niveles de dominio y reino, hasta los niveles de especies y variedades (Primack *et al.*, 2001). Dentro de las maneras de describir el nivel de variedades, se encuentra la diversidad genética, la cual se observa entre individuos de una misma población y entre poblaciones de una misma especie con distintos grados de aislamiento. Estas diferencias intraespecíficas son el resultado de factores detectables a lo largo del área de distribución natural de cada especie (Futuyma, 1997; Hedrick, 2000; Primack *et al.*, 2001).

El estudio de los mecanismos que mantienen o afectan a la diversidad biológica desde los niveles de poblaciones, individuos y genes es de suma importancia en el campo de la investigación científica y aplicable tanto para el rubro de la conservación como para la producción agropecuaria (Primack *et al.*, 2001). Por ejemplo, se sabe que la variación entre genes puede determinar diferencias en el desarrollo, la fisiología y/o la morfología de los individuos, que pueden favorecer a las poblaciones ante circunstancias ambientales adversas (Klug y Cummings, 1999; Hedrick, 2000; Primack *et al.*, 2001). Los horticultores y los criadores de animales aprovechan esta variabilidad genética para producir variedades o razas de una especie con alto rendimiento y resistencia a enfermedades en plantas como el maíz o la papa y en animales como la llama o los bovinos (Futuyma, 1997; Primack *et al.*, 2001).

En el medio natural sucede lo mismo; la capacidad de una población para adaptarse a un ambiente cambiante depende de su variabilidad genética. Las nuevas variaciones

genéticas pueden surgir en una población por mutación al azar o debido a la inmigración de individuos que portan variaciones genéticas diferentes desde otra población. La migración de individuos entre poblaciones y la mutación incrementa la variabilidad genética dentro de la población. Aunque la migración destaca como el factor de mayor importancia para compensar la pérdida de variabilidad genética causadas por la deriva génica o selección natural (Futuyma, 1997; Hedrick, 2000; Lacy, 1987).

La deriva génica se observa en poblaciones pequeñas donde son posibles las fluctuaciones aleatorias significativas de las frecuencias alélicas dependiendo de cuáles individuos sobreviven hasta la madurez sexual, se aparean y tienen progenie. Cuando un alelo tiene baja frecuencia en una población pequeña, tiene una probabilidad significativa de perderse en la siguiente generación (Klugh y Cummins, 1997; Hedrick, 2000; Primack *et al.*, 2001). En estas poblaciones (menos de 100 individuos), la probabilidad de que se presente una nueva mutación es demasiado baja como para contrarrestar la deriva génica (Lacy, 1987). En las poblaciones grandes la variabilidad genética en plantas y animales es mayor que en las pequeñas. Así pues, “la variación genética es menor en especies en peligro o con distribución restringida que en aquellas no amenazadas o con distribución amplia” (Frankham, 1996; Primack *et al.*, 2001).

1.2 Los cocodrilos de México

México alberga tres especies del orden crocodylia. La primera es un caimán, *Caimán crocodylus fuscus* y las otras dos son especies de cocodrilos verdaderos, *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* (Álvarez del Toro, 1974, Álvarez del Toro y Sigler, 2001; Cifuentes y Cupul, 2004). *C. acutus* y *C. moreletii* son las especies modelo y sujeto de este estudio. *Crocodylus acutus*, posee un cráneo alargado con una longitud del hocico 2.5 veces

el ancho de la base (Trutnau y Summerlad, 2006). Se distribuye a lo largo de todo el Pacífico mexicano desde el norte de Sinaloa hasta Chiapas, así como en la península de Yucatán (Álvarez del Toro y Sigler, 2001). *Crocodylus moreletii* tiene el cráneo más ancho que *C. acutus*, con una longitud del hocico de 1.7 veces el ancho de la base (Trutnau y Summerlad, 2006). Tiene una distribución que va desde Tamaulipas por todos los estados de la vertiente del Golfo de México y la península de Yucatán (Álvarez del Toro y Sigler, 2001).

El presente estudio utiliza un marcador molecular (“región control de la mitocondria”, RCmt) para evaluar la variación genética de las dos especies de cocodrilos a lo largo de su distribución en México. Se han publicado dos trabajos que utilizan DNA mitocondrial (mtDNA) para conocer la variación genética de especies de crocodylia. El primero, Glenn *et al.* (2002) evalúan dos fragmentos del mtDNA para *Alligator mississippiensis*: el citocromo *b* y la RCmt. Observaron un bajo nivel de diversidad genética encontrando tres haplotipos en un muestreo de 25 individuos a lo largo de toda su área de distribución. Compararon la secuencia obtenida del citocromo *b* con el genoma de la otra especie del mismo género (*A. sinensis*) obteniendo un 17.5% de diferencia en sustituciones nucleotídicas.

En el segundo trabajo, Ray *et al.* (2004) evaluaron la primera parte de la RCmt para *Crocodylus moreletii* en un muestreo amplio de las zonas bajas de Belice (130 individuos) incluyendo cinco individuos de Guatemala y cinco de México (Tabasco). Reportaron un bajo nivel en diversidad genética y se encontraron 45 sitios polimórficos para un total de 20 haplotipos en las 140 muestras. Sin embargo, las distancias entre las localidades fueron muy pequeñas, en promedio separadas 20 Km entre ellas. Las localidades más alejadas se encuentran a poco más de 400 Km entre sí, las más cercanas a 10 Km e incluso la localidad

New River y New River Lagoon están juntas. A pesar de haber evaluado la hipótesis de aislamiento por distancia, se llegó a la conclusión que la variación entre localidades es causada por hibridación. Observaron una transgresión del genoma mitocondrial de *C. acutus* en el de *C. moreletii*. El nuevo haplotipo híbrido fue llamado “*C. acutus-like*” o tipo-*C. acutus*, y se reportó para cuatro localidades.

Un punto a destacar que se discute en el trabajo de Ray *et al.* (2004), es la importancia de las localidades con haplotipos puros, ya que la hibridación afecta directamente a la heterogeneidad genética y según los autores, pone en riesgo la existencia de las dos especies. Debido a esto, las poblaciones que se identifican como genéticamente puras (por ejemplo las de Guatemala y México) deben ser protegidas vigorosamente. Los autores señalan que es necesario hacer estudios comparativos en marcadores nucleares y mitocondriales para *C. acutus* y también que se deben incrementar los estudios de muestras que estén fuera de Belice, priorizando el muestreo en aquellas poblaciones que sean puras, es decir que no presenten el haplotipo híbrido.

El presente estudio pretende obtener parámetros de diversidad genética en *C. acutus* y *C. moreletii*, para evaluar su variación intra e interespecífica y su comportamiento a lo largo del área de distribución en México.

1.3 Objetivo general

- Analizar la variación genética de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en México, y observar si existe una relación entre los patrones distribución geográfica y la variación genética.

1.4 Objetivos particulares

- Observar la diversidad genética de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en México y precisar en cuál de las dos especies es mayor.
- Examinar si existe una asociación entre la distribución geográfica y la variación genética para las dos especies.
- Advertir si la región control de la mitocondria es efectiva para análisis filogeográficos de cocodrilos de ambas especies en México.

1.5 Preguntas de investigación

Con base en las observaciones hechas en la investigación de Ray *et al.* (2004), el presente estudio lleva a cabo la tarea de expandir el área de muestreo de *C. moreletii* y hacer mayores las distancias entre las diferentes poblaciones. Además se evalúa la variación genética de *C. acutus* y *C. moreletii* en México, lo cual conlleva a una serie de preguntas ¿Cómo es la variación genética a lo largo de México para *C. acutus* y *C. moreletii*? y ¿la variación genética es mayor en alguna especie? Tomando como premisa que *C. acutus* y *C. moreletii* son dos especies bien diferenciadas fenotípicamente, ¿esto puede ser corroborado genéticamente evaluando la región control de la mitocondria?

2. ANTECEDENTES

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo, es preciso aclarar los términos usados, desarrollar la importancia de las herramientas utilizadas y conocer un poco de la historia de los cocodrilos en México. También es necesario hacer una caracterización clara de las especies evaluadas y conocer los planteamientos que han tenido a lo largo de su estudio biológico y evolutivo.

La evolución de la estructura genética y su mantenimiento en el tiempo y espacio están sujetos a la acción de las llamadas fuerzas evolutivas que tienen efectos divergentes. Por un lado, la selección natural, y la deriva génica favorecen la diferenciación genética entre poblaciones, mientras el flujo génico promueve la homogenización de la diversidad genética y minimiza el grado de diferenciación interpoblacional (Hillis, 1996; Avise, 1994, 2000; Hedrick, 2000; Primack *et al.*, 2001). El flujo génico es interrumpido usualmente por barreras geográficas o ambientales y en ocasiones por las actividades humanas que transforman el hábitat y separan a las poblaciones, empobreciendo así el acervo genético (Avise, 1994, Primack *et al.*, 2001). Para evaluar los parámetros de diversidad genética es necesario usar caracteres moleculares.

2.1 Caracteres moleculares

Los métodos de análisis molecular han sido incorporados en la identificación de especies, ya sea para encontrar especies crípticas o para saber si las especies que se estudian por separado son en realidad la misma especie o pertenecen a clados más alejados o más internos (Primack *et al.*, 2001). Los caracteres moleculares pueden ser de proteínas o de ácidos nucleicos y son de gran ayuda para entender las fuerzas evolutivas que moldean y mantienen la estructura genética de cada especie. También constituyen

una herramienta que puede proporcionar información sobre los mecanismos reproductivos, de hibridación, migración, tamaño efectivo de la población, distribución geográfica y medida de la variabilidad genética (Avice, 1994; Forstner y Forstner, 2001). Sin embargo, los estudios moleculares no son la panacea y no pretenden remplazar a los estudios en el sentido estrictamente morfológico o ecológico, pero de ellos se puede obtener información para la toma de decisiones sobre el manejo de poblaciones o especies y ayudan a responder preguntas hechas por la industria comercial (Forstner y Forstner, 2001; Primack *et al.*, 2001). Otra ventaja es que los animales no necesitan ser sacrificados para obtener una muestra e incluso pueden ser obtenidas de animales que hayan muerto o que se conserven como ejemplares en los museos (Avice, 1994; Forstner y Forstner, 2001). Al tomar muestras de animales que se encuentran en libertad, estamos evaluando individuos que continúan sosteniendo interacciones ecológicas y evolutivas en su medio. Los marcadores moleculares proporcionan evaluaciones básicas que puede usarse para ampliar el conocimiento de la diversidad biológica. Además de constituir una poderosa herramienta para implementar estrategias más efectivas de conservación, manejo y aprovechamiento de las especies (Primack *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2004).

En el campo de los Crocodylia, la aplicación de marcadores moleculares ha proporcionado información para todos los niveles de clasificación. Desde las relaciones dentro del género *Crocodylus* (Densemores y White, 1991; Ray y Densemores, 2002; García, 2004), hasta los niveles de subespecies (Brazaitis *et al.*, 1997) y de poblaciones (Glenn *et al.*, 1998, 2002; Dever *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2004). El grupo especialista en cocodrilos (CSG) perteneciente a la Unión Mundial para la Conservación (IUCN) remarca la actual importancia de estudios genéticos para la mayoría de las especies del orden Crocodylia, cuyos objetivos son obtener información básica de filogenia,

estructura poblacional y patrones de migración (Ross, 1998; Forstner y Forstner, 2001; Casas, 2003; Ray *et al.*, 2004). Álvarez del Toro y Sigler (2001) respaldan ésta afirmación señalando la importancia de estudios genéticos en nuestro país. Uno de los marcadores moleculares que han sido ampliamente estudiados son las secuencias de DNA mitocondrial. En seguida se mencionan las características y ventajas de su aplicación.

2.2 DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial (**mtDNA**) es una molécula circular, que existe en varias copias en cada mitocondria de cada célula en eucariontes (Avise, 1994). El mtDNA posee propiedades que lo hacen particularmente conveniente para el uso en filogenias y exámenes biogeográficos. Pereira (2000) refiere que el mtDNA se usa para hacer relaciones de parentesco recientes y en taxa de vertebrados para establecer diferentes niveles de filogenia. El éxito de su uso se debe a las características que presenta. Los dos autores coinciden en las siguientes características (Avise, 1994 y Pereira, 2000):

- a) Está constituido por genes empacados y compactos con regiones no codificantes.
- b) Es una secuencia de evolución rápida comparada con las secuencias nucleares.
- c) Es material de herencia materna y clonal por lo que carece de recombinación.
- d) Presenta algunas regiones traslapadas entre genes codificados en hebras opuestas.
- e) Tiene estatus de multicopia en una célula.
- f) Cuenta con proporciones variables de substitución entre genes.
- g) El orden del gen es relativamente conservado en la mayoría de los vertebrados.

Es importante señalar que un marcador molecular puede reflejar una historia y que ésta puede ser independiente de la de otros marcadores debido a los procesos que ha

sufrido. Aún dentro del mtDNA las tasas de mutación de los diferentes genes varían. Algunos se desarrollan con lentitud como en el caso de los ácidos ribonucleicos de transferencia (tRNAs), mientras que en otros la evolución es en una proporción más moderada como es el caso del citocromo *b*.

Dentro del genoma mitocondrial también hay secuencias que cambian rápidamente divergiendo en el tamaño y sucesión entre las especies y dentro de cada una de ellas. La región control de la mitocondria (RCmt) que contiene al “D-loop” (*displacement loop*) es una región no codificante que presenta un ritmo excepcional de sustitución nucleotídica y un nivel alto de polimorfismos intraespecíficos (Lunt *et al.*, 1998; Pereira, 2000). Así, la diversidad dentro de la propia molécula de mtDNA, en función del nivel de confección de marcador escogido, contesta a preguntas desde niveles filogenéticos hasta niveles poblacionales (Avice 2000). Por todo lo anterior, el mtDNA puede usarse para evaluar la diversidad genética y evaluar las diferencias regionales dentro de especies de crocodylia con base en sus polimorfismos (Glenn *et al.*, 1998).

2.3 Los haplotipos

En el presente trabajo, la combinación de un cierto grupo de *polimorfismos* son llamados *haplotipos*. Un polimorfismo genético se refiere a la presencia de dos o más alelos en una población, independientemente de sus efectos fenotípicos. El término polimorfismo es usualmente calificado en el sentido de que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor a 0.01. Un carácter que es no polimórfico se denomina monomórfico (Futuyma, 1997). Por su parte, el término haplotipo es una combinación (palabra compuesta) de “haploide y genotipo” (Wikipedia, 2007). Un haplotipo se define como una secuencia particular, que se distingue por que puede cambiar en uno o más pares de

bases (Futuyma, 1997) y que pueden o no compartir individuos dentro de una misma especie. En el cuadro 1 se muestran ejemplos de haplotipos. Como el presente trabajo trata de un estudio de mtDNA y la herencia es uniparental, no se presentan alelos, así que los diferentes haplotipos representan polimorfismos. Al igual que las palabras se constituyen de letras, las secuencias van formando palabras para ser traducidas en proteínas o funciones, según sea el caso, así pues cada palabra constituye un haplotipo al cambiar en una o más de sus letras.

Cuadro 1. Ejemplo de haplotipos. En la línea punteada [---] se observa el sitio polimórfico. Se observan dos haplotipos llamados arbitrariamente A y B.

Individuos	Secuencias	Nombre de los haplotipos
1	ATGCTGTAGGA	Haplotipo A
2	ATGCTCCAGGA	Haplotipo B
3	ATGCTCCAGGA	Haplotipo B

2.4 Trabajos sobre DNA mitocondrial

En el grupo de la herpetofauna se han realizado varios trabajos en cuestiones filogeográficas y de genética poblacional cuya herramienta principal es el mtDNA. Como ejemplos se refiere a las de víboras *Agkistrodon* spp. (Parkinson *et al.* 2000), las víboras de cascabel *Crotalus horridus* (Clark *et al.* 2003) y *Crotalus durissus* (Quijada-Mazcarreña *et al.*, 2007), para lagartijas (Haenel, 1997; Zaldivar-Riverón, 2005) e iguanas (Janke *et al.*, 2001). Existen pocos trabajos en cuanto a cocodrilos se refiere. Algunos de ellos se han hecho con cocodrilo del Nilo (*C. porosus*), aligátor (*Alligator mississippiensis*), caimanes (*Caiman crocodylus*), el cocodrilo de agua salada (*C. porosus*) y aligátor (*A. mississippiensis*) (Seuting *et al.*, 1994; Kumazawa y Nishida, 1995; Janke *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2000; Ray y Densmore, 2002; McAliley *et al.*, 2006; Xue-Feng *et al.*, 2006). De las especies que se encuentran en México, la más

estudiada en cuestiones genéticas es *Crocodylus moreletii*. Se han publicado una serie de trabajos desarrollados con microsatélites y mtDNA, (Dever y Densmore, 2001, Dever *et al.*, 2002) y de la evolución y sistemática del grupo con mtDNA y DNA de ribosomas nucleares (Densmore y White, 1991; Ray y Densmore, 2002).

Los primeros estudios publicados para el género *Crocodylus* en México se llevaron a cabo en la década de los 70's, donde Álvarez del Toro (1974), Casas y Guzmán (1970), y Guzmán (1973) fueron pioneros. Desde entonces se han desarrollado paulatinamente estudios sobre distintos aspectos de cocodrilos, abarcando temas muy importantes como distribución (Sigler, 1997), cría en cautiverio (Figuroa *et al.*, 1993; León, 1996; Aguilar *et al.*, 1998; Barrios *et al.*, 2005; Cupul, 2005), reproducción en vida libre y en cautiverio (Casas *et al.*, 1993; Casas y Barrios, 1997; Casas, 2002), hábitos alimenticios (Casas y Barrios, 2003), comportamiento en cautiverio (Huerta, 1986), estado de conservación (Lazcano, 1990; Cedeño-Vázquez, 2002; Cedeño-Vázquez *et al.*, 2006), análisis y dinámica poblacionales (Castillo, 2001, 2005; García *et al.*, 2007), morfometría (García, 2004; Rodríguez y Casas, 2005), concentración de DDT (Loa-Loza, 2007) y modelación y cambio climático (Casas y Reyna, 1994, Aguilar *et al.*, 2005; Ávila, 2007). Sin embargo, los temas relacionados con la genética han quedado de lado. Es preocupante que existan tan pocos estudios genéticos para cocodrilos en México y comenzar a desarrollar más estudios es de vital importancia para su manejo y conservación. El presente trabajo constituye uno de los primeros esfuerzos en lo que a estudios genéticos de cocodrilos en México se refiere.

2.5 Un poco de historia

La historia de los cocodrilos mexicanos ha sido de aprovechamiento desmedido. A mediados del siglo pasado las poblaciones fueron seriamente mermadas a causa de su

gran valor comercial en la industria peletera, su uso como alimento, medicina, o fueron masacrados cuando constituían una amenaza para el ganado o para el ser humano (Guzmán, 1973; Álvarez del Toro y Sigler, 2001; Cifuentes y Cupul, 2004). Todas estas prácticas aún se llevan a cabo, aunque al parecer en menor escala. En 1970 fue decretada una veda total de la explotación de cocodrilos en México. Los pescadores locales sustituyeron a los cocodrilos con el aprovechamiento de otras especies de los humedales provocando su destrucción gradual (Casas, 1995; Álvarez del Toro y Sigler, 2001; Cifuentes y Cupul, 2004; Domínguez-Laso, 2005). Sin embargo, hoy en día la situación está mejorando para los cocodrilos. Las poblaciones parecen estar recuperándose debido a la veda (Cedeño-Vázquez, 2002; Domínguez-Laso, 2005; Cedeño-Vázquez *et al.*, 2006).

Las dos especies del género *Crocodylus* en México se encuentran en el listado de la NOM-059-ECOL-2001 dentro de la categoría *Pr*, “sujeta a protección especial” y en la lista de especies prioritarias (Real Decreto, 1997/1995). Para efectos de organismos internacionales ambas especies se encuentran en el apéndice I de CITES. *C. acutus* está en la categoría VU “vulnerable” y *C. moreletii* se encuentra en la categoría LR/cd “riesgo bajo dependiente de conservación” para la IUCN (Ross, 1996). Por lo anterior es necesario llevar a cabo estudios de índole genético encaminadas a la conservación de estas especies y con ello de su entorno.

El interés principal de los cocodrilos en México sigue siendo su explotación comercial. Es común encontrar más productores y comercializadores en reuniones y convenciones acerca de cocodrilos, que investigadores interesados en desarrollar conocimiento sobre aspectos de su biología. Hay mucho por estudiar de los cocodrilos y la academia en nuestro país debemos sumar esfuerzos para promover que el número de publicaciones vaya en aumento con trabajos enriquecedores.

2.6 Las dos especies

Una de las tareas más importantes que ha llevado a cabo la biología evolutiva es el definir las entidades reales de estudio, las especies. Si no se puede definir la unidad que estamos estudiando, el trabajo que se realiza pierde importancia y credibilidad. Para fines del presente estudio, el cual toma como modelo a dos especies de cocodrilos, es importante adoptar un concepto de especie y ponerlo a prueba. En el presente estudio se toma el concepto cohesivo de especie (Templeton, 1989), que se define como “población más inclusiva de individuos que posee el potencial para la cohesión fenotípica a través de mecanismos intrínsecos de cohesión”. Estos mecanismos les confieren unión morfológica, ecológica, genética, de comportamiento y de historias de vida (Templeton, 1989).

Las dos especies de cocodrilo que se toman como modelo para el presente estudio son *C. acutus* también llamado cocodrilo americano y *C. moreletii* también conocido como cocodrilo de pantano, por lo que es necesario definir los caracteres que los distinguen. Estos caracteres se describen en el cuadro 2, el cuál remarca una cohesión fenotípica que bajo el concepto cohesivo de especie debe ser reflejada en una cohesión genotípica, lo cual refuerza una de las hipótesis planteadas en el presente trabajo. Una característica de suma importancia es que en el límite sureño de *C. moreletii*, *C. acutus* se distribuye en simpatría (Ross, 1989). Además existen sitios donde la simpatría es debido a la introducción accidental fuera de su área natural de distribución. Con fines de restablecimiento de poblaciones y a causa del interés comercial que poseen las especies se han llegado a introducir en la laguna de Chacahua en Oaxaca (Muñiz *et al.*, 1997) y la laguna de Alcuzahue en Colima (Loa-Loza, com. pers.). Ambos casos son introducción de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en la vertiente del Pacífico Mexicano. Esta simpatría debe ser tomada en cuenta para

entender los procesos que actualmente se llevan a cabo dentro de las poblaciones de las especies de interés.

Cuadro 2. Características de *C. acutus* y *C. moreletii* (Álvarez del Toro, 1974; Hunt, 1975; Casas y Rogel, 1989; Ross, 1989; Pérez-Higareda *et al.*, 1995; INE/SEMARNAT, 2000; Álvarez del Toro y Sigler, 2001; Alderon, 2004; Cifuentes y Cupul, 2004; Navarro, 2005; Trutnau y Summerland, 2006).

Caracter	<i>Crocodylus acutus</i>	<i>Crocodylus moreletii</i>
Forma del cráneo	Alargada, va de 1.8 a 2.5 veces el ancho de la base	Ancha, de 1.5 a 1.7 veces el ancho de la base
Talla	Llega a medir hasta 6 m aunque hoy la longitud máxima que se observa es poco más de 4 m	Hasta 4 m, aunque hoy día no se ven muchos individuos que sobrepasan los 2.5 m
Escamas subcaudales	Presentan un patrón regular, continuo	Presenta una interrupción por grupos de escamas pequeñas
Osteodermos y quillas	Presentan quillas muy elevadas, tanto más cuanto mayor es la edad del individuo. Se puede distinguir por la reducción dramática en los osteodermos de la superficie dorsal, en menor número que en cualquier otra especie de cocodrilo	Tiene escudetes casi planos o con quillas poco marcadas
Distribución geográfica	En la costa del Pacífico desde Sinaloa México hasta Perú y la del Atlántico desde Florida EUA, pasando por las Antillas, hasta Venezuela	En el Golfo de México desde Tamaulipas hasta Yucatán, en la zona de Petén Guatemala y Belice
Coloración	Los juveniles son de colores claros, comúnmente de amarillento bronceado a gris pálido ligeramente verdoso con manchas en el cuerpo y la cola. Cuando van creciendo, estas marcas se atenúan y en los adultos son por lo general café oliváceo o bronceado (en algunas poblaciones más oscuras) con o sin manchas o bandas negras	Es muy variado en color las variantes van desde un tono notablemente amarillo hasta una variedad parda o de color marrón grisáceo que prácticamente carece del jaspeado amarillo, con manchas negras en el cuerpo y la cola, generalmente más oscuro que el cocodrilo americano
Hábitat	Habita principalmente en cuerpos de agua salobre en la zona costera, aunque en Chiapas y Jalisco se le ve en cuerpos de agua continentales. También ha colonizado islas como las Marías	Habita preferentemente en cuerpos de agua dulce pero en zonas de baja altitud
Movilidad	Es un carácter importante de su biología y probablemente sea de gran importancia para su distribución actual. Suele dar caminatas en la noche, particularmente en las lluviosas, en ocasiones incluso cambiando de un río a otro o internándose tierra adentro a distancias de dos kilómetros de cualquier cuerpo de agua, se trata siempre de animales solitarios	En el interior de la selva pueden encontrarse individuos aislados en pequeños cuerpos de agua, como lagunas o cenotes, a los cuales acceden gracias a la capacidad que tienen para realizar desplazamientos moderados por tierra
Madurez sexual	2.5 m de longitud total	1.5 m longitud total

Continúa cuadro 2

Caracter	<i>Crocodylus acutus</i>	<i>Crocodylus moreletii</i>
----------	--------------------------	-----------------------------

Nidada	Ponen de 21 a 60 huevos en agujeros excavados en al arena o barro mezclado con hojarasca	De 20 a 45 huevos en un montículo de vegetación con arena, aunque en lugares donde la vegetación es escasa llegan a cavar agujeros
Gestación	Los huevos eclosionan a los 90 días de incubación	80 días de incubación
Temporada de nidación	Varía de acuerdo a la localidad, de enero a mayo	De mayo a julio
Comportamiento	Desarrollan conductas de cuidados paternos, en especial las hembras da protección y vigilancia al nido. Cuida de las crías en las primeras semanas	Hembra y macho proporcionan cuidados al nido y a las crías
Cortejo	El cortejo tiene lugar exclusivamente en el agua. Los machos defienden un territorio y vocalizan un llamado que es respondido por los otros machos	Emiten un llamado, realizan un rito de cortejo dentro del agua levantando la cabeza y con otros sonidos que hacen vibrar el agua

2.7 Las especies simpátricas y sus conflictos

La introducción de especies en lugares de donde no son originarias, conlleva una serie de problemas importantes. Como señala Darwin (1859), especies muy próximas (del mismo género) rara vez se encuentran juntas ya que normalmente tienen muchas similitudes en sus hábitos, constitución y estructura. Por lo tanto la lucha será siempre mucho más fuerte entre ellas que entre las especies de distintos géneros. La distribución de una especie se ve limitada con la presencia de otra especie que emplea el mismo tipo de recursos y tienen hábitos semejantes. La competencia afecta la dinámica de las poblaciones de las especies competidoras y del entorno, lo que influye en la evolución de las especies (Krebs, 1985; Begon, *et al.*, 2006). El proceso que siguen especies semejantes en una distribución simpátrica actualmente es conocida como el principio de la exclusión competitiva, en el cual dos poblaciones sin cruzamiento que están en la misma relación con el mismo hábitat no pueden ocupar el mismo territorio indefinidamente, por lo que más temprano que tarde, una de ellas desplazará a la otra (Bartholomew y Hudson, 1961; Begon *et. al.*, 2006).

Por otra parte tenemos el problema de las especies que han sido determinadas como diferentes que se llegan a cruzar entre sí, un proceso denominado hibridación. La

hibridación se puede definir también como el producto del cruce de dos padres con genotipos diferentes (Klug y Cummings, 1998). En el caso de los cocodrilos y otros animales, esta coincidencia de especies distintas se puede dar a causa de que son introducidos por el ser humano a lugares donde no se distribuyen naturalmente. Hoy en día existen pocos lugares con más de dos o tres especies de Crocodylia en la misma región en general (Thorbjarnarson, 1992) y la mayoría de las especies simpátridas de Crocodylia se segregan ecológicamente entre sí (Magnusson, 1985; Webb, 1986; Mangusson *et al.*, 1987; Ouboter, 1996; Meshaka *et al.* 2000; Cedeño *et al.* 2006). Aunque también se sabe de que la hibridación entre cocodrilos se lleva a cabo como en el caso de *C. rhombifer* y *C. acutus* (Ramos *et al.*, 1994; Ramos, 2006). Para las especies mexicanas, su relación simpátrida está estudiada para la región del norte de Belice y el sureste de México (Lazcano, 1990; Merediz, 1999; Platt y Thorbjarnarson, 2000; Cedeño-Vázquez, 2002; Domínguez-Laso, 2002; Cedeño-Vázquez *et al.*, 2006). Sin embargo, el patrón que presentan las dos especies en esta zona parece ser que al mermar las poblaciones de una especie (*C. moreletii*) se produjo una invasión de nicho por parte de la otra (*C. acutus*). A pesar de esta simpatría, se observa que existen áreas donde solo se distribuye *C. moreletii* y donde *C. acutus* parece estar siendo desplazado (Cedeño-Vázquez *et al.*, 2006). Ray *et al.*, (2004) proponen que existe evidencia de hibridación para poblaciones de las zonas bajas de Belice. Esta probable hibridación se observa de la evaluación de parámetros de diversidad genética que son usados en el presente trabajo.

2.8 La hibridación

La hibridación entre el cocodrilo de pantano y el cocodrilo de río, ha sido reportada en varias ocasiones, (Sigler, 1998; Cedeño-Vázquez, 2002; Domínguez, 2002; Ray *et al.*, 2004). Una de las hipótesis de hibridación que expone Sigler (1998) es una

posible cruza entre un macho *C. moreletii* con una hembra *C. acutus* lo que fortalece la hipótesis de la introgresión del segundo en el primero. No obstante, en la actualidad la situación de la hibridación sigue siendo controversial debido a que en los trabajos que ha reportado hibridación (Sigler, 1998; Ray *et al.*, 2004) solo la plantean en forma de hipótesis, carecen de un análisis morfológico completo y le dan mayor peso a parámetros de diversidad genética basados en mtDNA.

Para tener una evaluación correcta de la diversidad genética es importante usar marcadores moleculares, uno de ellos es el mtDNA, el cual posee una región particularmente cambiante que es la RCmt. Ésta se secuenció para observar la variación genética de las dos especies de cocodrilos en México. Las cuales presentan una distribución simpátrica, lo que nos lleva al conflicto de la hibridación. Este problema de la hibridación se aborda en la discusión. Los métodos empleados para la evaluación de la diversidad genética y observación de la variación genética se desarrollan en la siguiente sección.

3. MATERIAL Y MÉTODO

Para poder responder a las preguntas planteadas en el presente trabajo, se comenzó por la obtención de muestras del campo, seguido de la extracción, amplificación y secuenciación de DNA. Por último se llevó a cabo el análisis de secuencias con cuatro programas para evaluar la diversidad genética, construir árboles de distancia, redes de haplotipos y relacionar los haplotipos con su distribución geográfica.

3.1 Colecta de muestras

Se obtuvieron en total de 62 muestras de sangre de las dos especies del género *Crocodylus* de México, provenientes de diez estados de la república. De estas muestras 37 son individuos de *Crocodylus acutus*, de 13 localidades, muestreándose de uno a seis individuos por localidad. Las localidades están alejadas 139 Km en promedio una de la otra. Las localidades más cercanas están a 52 Km y las más alejadas a 580 Km aproximadamente. Para *C. moreletii* se tomaron muestras de 25 individuos de ocho localidades, muestreándose de uno a siete individuos por localidad. Las localidades se encuentran alejadas en promedio 203 Km una de la otra. Las localidades más cercanas están a 38 Km y las más alejadas a 375 Km aproximadamente.

La mayoría de las muestras fueron proporcionadas por el M. en C. Eleazar Loa Loza; las muestras de Tabasco, Oaxaca y algunas de Chiapas fueron colectadas también por M. en C. Eleazar Loa Loza y por el autor. Las muestras del Cañón del Sumidero fueron proporcionadas por el Biól. Jerónimo Domínguez-Laso.

Tres muestras de la localidad de Alcuzahue Colima, donde *C. acutus* se distribuye naturalmente, presentaron irregularidades en los osteodermos nucales y se catalogaron como fenotipo atípico. No obstante, se le determinó como *C. acutus* (Loa Loza, com. pers.).

De este mismo sitio se colectaron también tres muestras de *C. moreletii* que fueron introducidos de la granja “El Fénix” que se encuentra en Ciudad del Carmen, Campeche con fines de reproducción en cautiverio para aprovechamiento en la industria peletera en la década de los 80’s. En la figura 1 se observan los sitios de colecta.

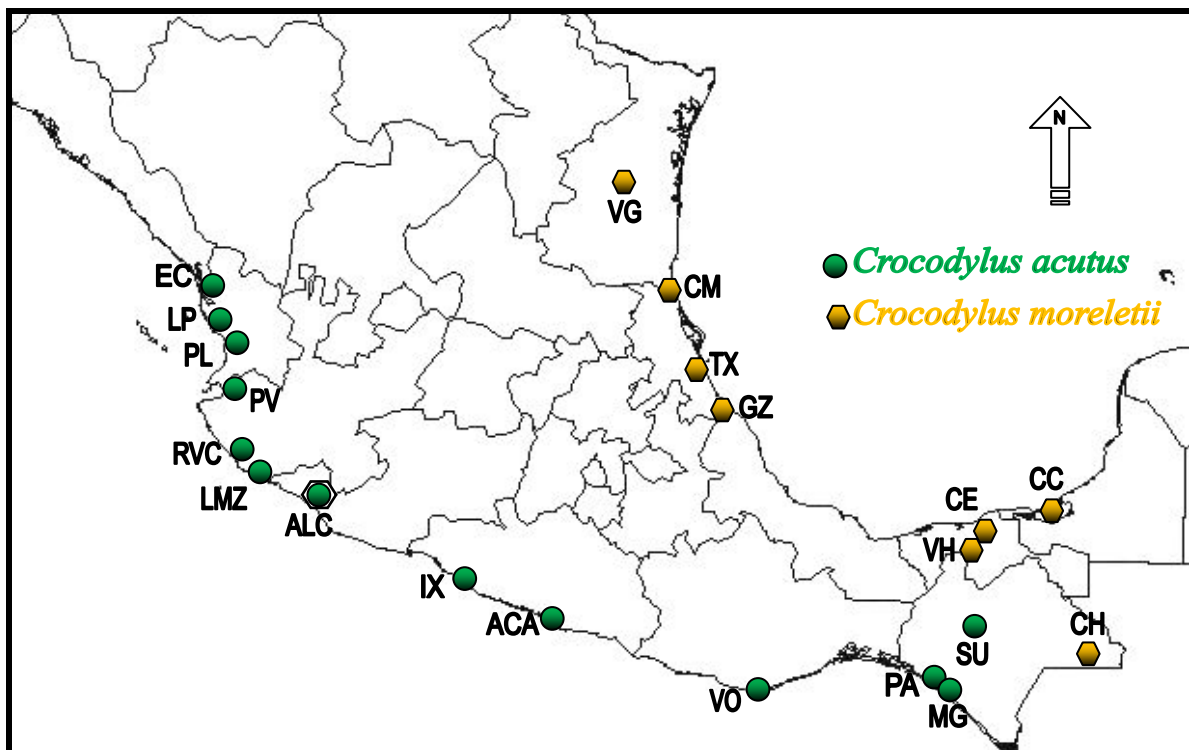


Figura 1. Colectas de *Crocodylus acutus* (●) y *C. moreletii* (⬡) en México. Las localidades para *C. moreletii* se muestran como hexágonos con diagonales y corresponden a ACA-Acapulco (Guerrero), ALC-Alcuzahue (Colima), EC-Esteros de Coahuila (Coahuila), RVC-Reserva de la Biosfera de la Sierra de Manantlán (Jalisco), IX-Ixtapa (Guerrero), LMZ La Manzanilla (Jalisco), LP-La Palma (Nayarit), MG-Manguillo (Oaxaca) PA-Puerto Arista (Chiapas), PL- Platanillo (Nayarit), PV- Puerto Vallarta (Jalisco), VO-Ventanilla (Oaxaca), SU-Cañón del sumidero (Chiapas). Mientras que las localidades para *C. acutus* se muestran como círculos con puntos y corresponden a VH-Villahermosa (Tabasco), CE-Pantanos de Centla (Tabasco), CH-Chajul (Chiapas), ALC-Alcuzahue*(Colima). *Población que contiene a las dos especies, donde *C. moreletii* proviene de la granja “El Fénix” en Ciudad del Carmen Campeche), TX-Tuxpan (Veracruz), CM-Ciudad Madero (Tamaulipas), GZ-Gutiérrez Zamora (Veracruz), VG-Vicente Guerrero (Tamaulipas). La localidad de Alcuzahue se destaca por hexágono con puntos porque es una localidad donde se distribuyen las dos especies.

3.2 Trabajo de campo

Las muestras se tomaron del seno craneal con una aguja hipodérmica en vacutiners para obtener dos muestras de sangre por individuo que se fijaron en buffer para sangre (TRIS 100 mM, EDTA 100mM, NaCl 100mM y SDS 1% a pH 8) y en alcohol absoluto (etanol). Inmediatamente se rotularon con información de especie y localidad, y se anotó la georeferencia y la fecha de colecta. Se tomaron fotografías de los individuos muestreados para obtener referencias subsecuentes.

3.3 Trabajo de Laboratorio

Se hizo la extracción de DNA de 62 muestras a partir de sangre obtenidas en campo de *C. acutus* y *C. moreletii* con base en el siguiente protocolo:

3.4 Extracción de DNA (fenol-cloroformo) a partir de sangre (Maniatis, 1982)

Para todas las centrifugaciones se usó una Eppendorf Centrifuge 5415D (max. 13200 rpm = 24x3,75 g).

1. En un tubo de 1.5 mL se vertió 360 µL de buffer STE (NaCl 100mM, EDTA 10mM y Tris-HCl 50mM), agregando 150 µL de sangre y 40 µL de SDS al 10 %. Se agregaron 5 µL de proteinasa K (10 mg por mL). Se aplicó agitación vertical e incubaron a 60 – 65 °C por al menos 3 horas.
2. Se agregaron 400 µL de fenol saturado. Se aplicó agitación vertical por algunos segundos, para mezclar bien. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos.
3. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 400 µL de cloroformo-isoamílico (cloroformos y alcohol isoamílico 24:1). Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos.

4. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se agregaron 400 μL de cloroformo-isoamílico (24:1). Se aplicó agitación vertical por unos segundos hasta mezclar bien. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos.
5. Por tercera vez se recuperó el sobrenadante en la 4ª serie de tubos y agregaron dos partes de etanol al 95 % (-20 °C) por una de muestra (aproximadamente 700 μL), se agregó 36 μL de NaCl 5M.
6. Se refrigeró a -20 °C durante 2 horas y centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.
7. Se decantó el sobrenadante con cuidado de no llevarse el pellet (ayudarse con una pipeta de 200 μL), se agregó 1 mL de etanol al 70 % a -20 °C y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
8. Se retiró el sobrenadante por decantación, con cuidado de no llevarse el pellet (ayudados con una pipeta de 200 μL). Los tubos fueron secados en centrífuga de vacío ó dejarlos abiertos toda la noche en cámaras de unicel.
9. Las muestras se resuspendieron en 200 μL de agua bi-destilada esterilizada (inyectable).

3.5 Gel de agarosa al 1%

Para corroborar que había presencia de DNA, de amplificación por PCR y purificados, se realizaron geles de agarosa al 1% (Sambrook y Rusell, 2001).

1. Se pesaron 0.4 g de agarosa, se vaciaron en un matraz y se agregaron 40 mL de TBE (buffer) 0.5X.

2. Se calentó en el microondas tapando el matraz con un vaso de precipitados, durante 40 segundos, en caso de que hubieran grumos todavía, se calentó por 10 segundos más.
3. Se dejó enfriar hasta que sea tolerable al tacto (mientras el gel se enfriaba se preparaba la tina con los peines), posteriormente se agregó una gota de bromuro de etidio (0.625 mg/mL), inmediatamente se movía en el matraz para mezclar.
4. Se vació en la tina y se dejó cuajar 25 minutos.
5. Por último se retiraron los peines y el gel.

3.6 PCR y secuenciación

Se sintetizaron oligonucleótidos publicados por Ray y Densemore (2002):

tPheLF: 5'- GAA CCA AAT CAG TCA TCG TAG CTT AAC -3'

CR2HR: 5'- GGG GCC ACT AAA AAC TGG GGG -3'

Los oligonucleótidos se usaron para las 2 especies *C. moreletii* y *C. acutus*. Se amplificó aproximadamente la mitad de la RCmt, (~540 pares de bases, bp), correspondientes a la primera parte de la región, dividida en los dominios I, II y parte del dominio III, teniendo tPhe y la otra mitad del dominio III como secuencias flanqueantes (figura 3).

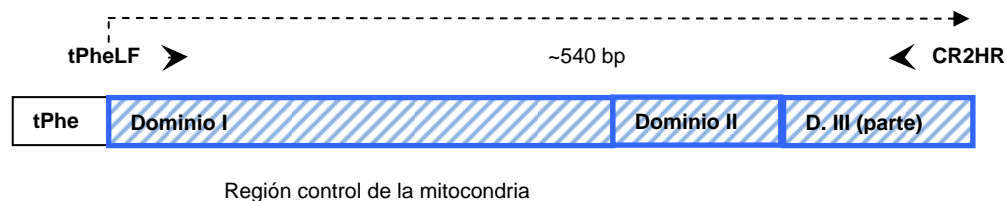


Figura 3. Fragmento de la región control de la mitocondria, compuesta por el dominio I, dominio II y parte del dominio III, de ~540 pares de bases (bp). Los oligonucleótidos usados (tPheLF y CR2HR) se muestran en la parte de arriba.

Cada reacción se hizo de 25 μL (22 μL de master-mix y 3 μL de DNA templado). Se calcularon las cantidades de todos los reactivos, incluyendo el buffer 10X, oligonucleótidos (0.05 μM /cada oligonucleótido), dideoxinucleótidos ó dNTP's (0.08 mM), *Taq* polimerasa (5U/ μL), y MgCl_2 (1 mM). Los controles negativos fueron tomados en cuenta a la hora de preparar el master-mix. Se tomó reactivo para una reacción más de las que se necesitó hacer. Después de agregar la cantidad correspondiente de master-mix en cada tubo, se adicionó el templado y se colocaron los tubos en la termocicladora (PCR Gene Amp[®], modelo PCR System 9700) con el siguiente ciclo:

	Temperaturas	Tiempo	
1.	80°C	10 seg.	35 ciclos
	94°C	3 min.	
2.	94°C	45 seg.	
	56°C	45 seg.	
	72°C	45 seg.	
3.	72°C	3 min	
	4°C	∞	

Purificación de productos de PCR

Una vez que se verificaron las amplificaciones, éstas fueron purificadas con el Kit para purificar de productos de PCR, QIAquick PCR Purification Kit (250), siguiendo el protocolo del manual.

PCR de secuenciación

Se hicieron reacciones de PCR de secuenciación para un volumen total de 10 μL usando: Agua desionizada o inyectable (2 μL), Terminator Ready Reaction Mix (BIG DYE) (concentración), Buffer 2.5X, oligonucleótido (5' y 3' por separado) (2 μm) y DNA de la muestra previamente amplificada (3 μL).

El Big-Dye incluye los dNTP's marcados con fluorescencia que son muy sensibles a la luz, por lo que se debe usarlo y regresarlo inmediatamente para evitar la exposición a la luz. Se hicieron 2 reacciones por muestra, una con el oligonucleótido tPheLF y otra con el oligonucleótido CR2HR. Se pusieron las reacciones en la termocicladora con el siguiente programa:

Temperaturas	Tiempo	
1. 96°C	5 min.	25 ciclos
2. 96°C	10 seg.	
3. 50°C	5 seg.	
4. 60°C	4 min.	
5. 4°C	∞	

Al salir de la termocicladora, los productos se pueden guardar de 3 a 4 meses a menos 20°C. Fue necesario guardar los tubos cubriéndolos con papel aluminio y en cajas para que no les diera la luz.

Purificación de productos de PCR de secuenciación

Se usaron columnas Centri-sep (Princeton Separations P/N CS-901) para purificar cada muestra de PCR de secuenciación. A cada columna se le colocó la tapa inferior y se agregaron 750 µL de Sephadex preparado (2.6 gramos de Sephadex en 40 mL de agua destilada) y se le sacaron las burbujas, dejando reposar 5 minutos. Se quitaron las tapas inferiores y se colocaron en los tubos colectores, dejando que el agua fluyera al tubo colector hasta que el Sephadex se puede ver acumulado. Se decantó el agua recolectada en el tubo. Se centrifugaron las columnas a una velocidad de 2800 rpm por dos minutos. Poniendo atención en la posición de las columnas.

Se rotularon tubos de 1.5 mL con el número de las muestras a procesar. Se agregaron 10 μ L de agua inyectable a cada tubo con la reacción de secuenciación. Se quitaron las columnas de lavado y se colocaron dentro de los microtubos de 1.5 mL. Se tomaron las muestras que contenían la reacción de secuenciación y se depositó cada una en el centro de la columna interior de Sephadex, evitando que se quedara la muestra en las paredes. Se centrifugaron las columnas junto con el microtubo a una velocidad de 2800 rpm por tres minutos, procurando que las columnas estuvieran en la misma posición en de la primera centrifugación. Se sacaron los tubos y desecharon las columnas de Sephadex sin desechar las columnas de centri-sep. Se secaron los tubos en el concentrador por 25 minutos, a una temperatura de 30°C.

Para comenzar la secuenciación automática. Se agregaron 15 μ L de formamida en cada tubo de 1.5 mL con la muestra seca. Se centrifugaron a 13000 rpm durante cinco minutos. Se separaron cada una de las muestras en las placas para secuenciador y se taparon con tapas especiales. Se calentaron las muestras a 95° C por tres minutos y se enfriaron inmediatamente con hielo. Se hizo la captura de la hoja de muestras en el secuenciador ABI PRISM[®] modelo 3100 Genetic Analyzer y colocar las placas en su sitio. Del secuenciador, se obtuvieron los formatos ABI para forward y reverse, de cada secuencia y se corrigieron los formatos obteniendo un consenso usando de Sequencher 4.6 (Gene Code, Ann Arbor, Michigan).

3.7 Análisis filogenético

El alineamiento se hizo manualmente en el programa BioEdit (Hall, 1999) y se guardó en formato NEXUS y FASTA. Para encontrar el modelo que mejor se ajustó a los datos se usó Modeltest 3.06 (Posada y Crandall 1998). El modelo fue usado para obtener el

árbol de distancia con el programa Geneious 1.0 (2006). Se tomaron en cuenta A, T, G y C como los estados de carácter válidos para el análisis, los gaps (inserciones u omisiones) fueron tomados como datos faltantes (?). Se aplicó bootstrap paramétrico con 1000 réplicas, para conocer el porcentaje de árboles que presentan la misma topología y poder saber cuáles son los clados más estables y los más confiables. Usando Neighbor joining (Saitou y Nei, 1987), se generaron en total dos árboles de de haplotipos únicos para los cocodrilos de México y para todas las muestras reportadas en el Genbank (AY136686-AY136738 y AY341444-AY341530). El primer árbol incluyó los tres haplotipos de *C. moreletii*, los dos haplotipos de *C. acutus*, se incluyeron tres grupos externos, *C. niloticus*, (AF460211) *C. rhombifer* (AF460214) y *C. intermedius* (AF460207). *C. intermedius* en realidad es un grupo interno, debido a que otros trabajos se agrupa cercanamente a *C. acutus*. (Ray *et al.*, 2004; García, 2004). El segundo se infirió para los haplotipos obtenidos por Ray *et al.* (2004), incluyendo el haplotipo P que no se incluyó y los haplotipos de México obtenidos en el presente estudio con el fin de integrar los datos obtenidos por ambos trabajos.

3.8 Evaluación de la diversidad genética

Para cada una de las especies se infirieron los parámetros poblacionales con el programa Arlequín 2.000 (Schneider *et al.*, 2000). Una medida muy útil de diversidad genética para inferir la historia demográfica general dentro de una especie es la diversidad haplotípica (*h*) (Nei, 1987), que condensa la información en el número y frecuencia de los diferentes alelos en un locus, sin tomar en cuenta las relaciones entre sus secuencias (Avise, 2002). Se expresa en la siguiente ecuación:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

Donde n es el número de copias del gen en la muestra, k es el número de haplotipos, y p_i es la frecuencia del i ésimo haplotipo (Nei, 1987; Avise, 2000).

Otro parámetro importante para la evaluación de la diversidad genética se conoce como la variación nucleotídica o diversidad nucleotídica y se reconoce con la letra π (Nei, 1987). Éste toma en cuenta el número de bases diferentes entre secuencias y pondera si las secuencias son las mismas o diferentes. La diversidad nucleotídica representa el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias (Page y Holme, 1998; Avise, 2000; Hedrick, 2000). Lo anterior se expresa en la siguiente ecuación,

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij},$$

Donde d_{ij} es un estimado del número de mutaciones que han ocurrido desde la divergencia entre el i ésimo y el j ésimo haplotipos, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i y p_j es la frecuencia del haplotipo j (Nei, 1987; Avise, 2000). Para darle al archivo el formato requerido por Arlequín se usó un la página de internet FaBox (<http://www.daimi.au.dk/~biopv/php/fabox/>).

3.9 Revisión de muestras con distribución simpátrida

Dentro del análisis de haplotipos se realizó una comparación de los genomas de los cocodrilos dentro de la localidad de Alcuzahue. En esta laguna están presentes las dos especies, de los cuales tres se identificaron con base en su morfología como *C. acutus*, aunque presentaban patrones atípicos. Se observaron los diferentes haplotipos con el fin de

evaluar si existe introgresión de un haplotipo *C. acutus* hacia el haplotipo *C. moreletii*, lo que clasifican Ray *et al.* (2004) como evidencia de hibridación.

3.10 Redes de haplotipos y su correspondencia geográfica

Se realizó una serie de cuatro redes de haplotipos con base en Median-joining con el programa Network (Bandelt *et al.*, 1999). La primera red se generó para los haplotipos *C. moreletii* de México (n=24); la segunda red fue para las 2 especies en México y se incluye el haplotipo de la especie *C. intermedius* (n=58); la tercera para los haplotipos de *C. acutus* de México y los haplotipos de tipo-*C. acutus* obtenidos del artículo de Ray *et al.* (2004) (n=59). Para cada red se hizo una superposición de los haplotipos se en mapas de las con las localidades correspondientes.

3.11 Análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA)

Se hizo una red de haplotipos usando el programa TCS 1.2.1 (Clements *et al.*, 2000) para construir el anidamiento de clados para todas las muestras obtenidas en el presente trabajo más las muestras de *C. moreletii* y tipo-*C. acutus* de Belice y Guatemala (n=197). Después de obtener la red se anidaron los clados a partir de las puntas, uniendo los haplotipos que tenían un solo cambio entre ellos y uniéndolos con los nodos “faltantes”, en el siguiente nivel de anidamiento, se hace lo mismo pero con los grupos del primer nivel de anidamiento, como se muestra en la figura 4.

Los anidamientos se superpusieron en mapas con los puntos de distribución correspondientes a cada localidad. A partir de la anidación de clados, se corrió un análisis filogeográfico de clados anidados con el programa GeoDis (Posada y Templeton, 2006).

Este programa calcula tres parámetros: a) D_c -Distancia de clados: mide en la extensión geográfica del clado, b) D_n - Distancia del clado anidado: mide cómo está distribuido geográficamente un clado respecto a otro clado en el mismo nivel de categoría de anidamiento, y c) I-T-(Interior-Tip) distancia de interior-punta: se estima en cada categoría de anidamiento, a partir del promedio de las distancias interiores menos el promedio de la distancia en las puntas. El programa se basada en la hipótesis nula de que no hay asociación geográfica de haplotipos.

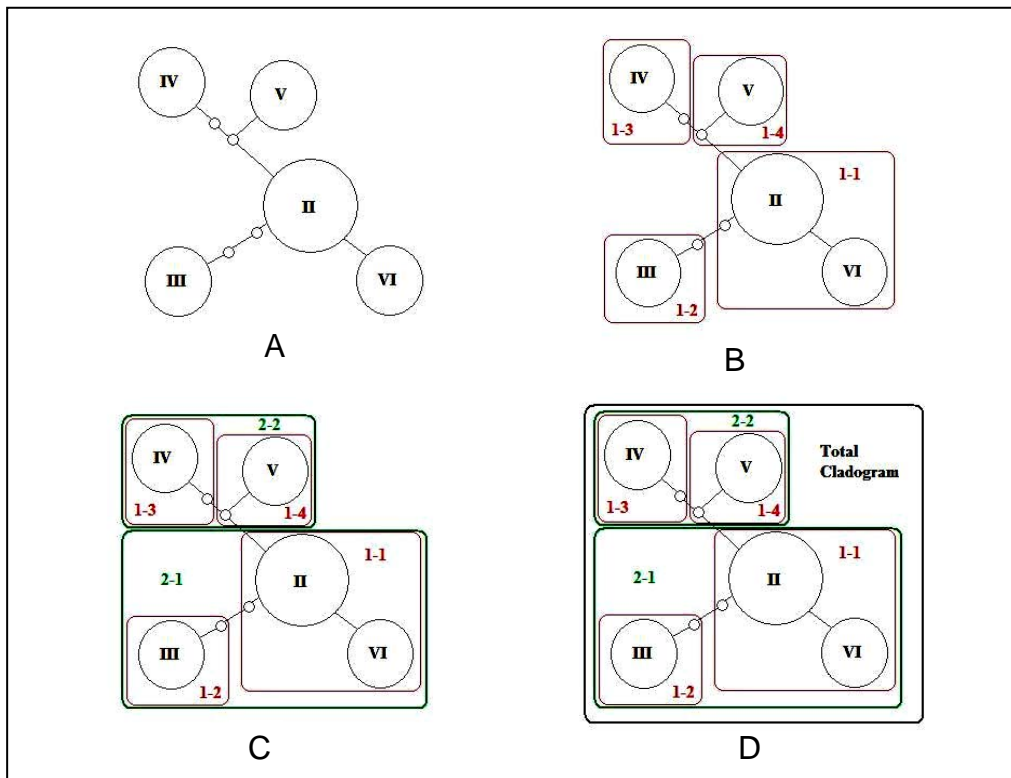


Figura 4. Esquema para hacer la anidación de clados, comenzando con A representa la red de haplotipos, B el primer nivel de anidamiento, C el segundo nivel y D el Total Cladogram.

Para construir los formatos GeoDis es necesario tener los puntos georeferenciados de las localidades de colecta. Los puntos de Belice fueron proporcionados por el Dr. David Ray, las localidades de Tabasco y Petén (Guatemala) se calcularon a partir de los puntos

observados en el trabajo de Ray *et al.* (2004) con el programa Google Earth (2007 Euro Technologie Image 2007 TerraMetrics Image 2007 NASA).

Al obtener el archivo de salida, se revisó la clave de GeoDis (11nov2005). Para tener una mayor claridad en la interpretación de la clave. Ésta fue traducida y puede ser consultada en el Apéndice B. En el cuadro 3 se muestran todos los análisis realizados para el presente trabajo, así como el número de secuencias consideradas, su origen y los grupos externos usados (si fue el caso).

Cuadro 3. Análisis en el presente trabajo. Se muestra el número de secuencias y los haplotipos considerados. Donde las abreviaturas son: Ca=C. *acutus*, Cm=C. *moreletii*, tCa=tipo-C. *acutus*, Cr=C. *rhombifer*, Ci=C. *intermedius*, Cn=C. *niloticus*.

Prueba	Número de secuencias	Secuencias incluidas	Grupos externos
Neighbor Joining	8	Secuencias Ca y Cm del presente estudio con grupos externos	Cr, Cn y Ci
	35	Haplotipos de Ray <i>et al.</i> (2004) Belice, Guatemala y México; y haplotipos del presente estudio con grupos externos	Cr, Cn y Ci
Network	24	Secuencias de Cm de México	
	58.	Secuencias de Ca y Cm de México con grupo externo	Ci
	59	Secuencias de Ca registrados en México y de tCa de de Ray <i>et al.</i> (2004).	
	97	Secuencias de Cm de México, Guatemala y Belice	
Mapa de haplotipos	21	Secuencias de Cm de México	
	74	Secuencias de Ca y tCa de México y Belice respectivamente	
	57	Secuencias de Ca y Cm de México	
TCS para GEODIS	197	Secuencias de Ca, Cm y tCa de Ray <i>et al.</i> (2004) Belice, Guatemala y México; y haplotipos del presente estudio con localidades	

4. RESULTADOS

4.1 DNA templado

Se obtuvo el DNA de 62 muestras de cocodrilos, 37 para *C. acutus* y 25 para *C. moreletii*. En la figura 5 se muestra uno de los geles para observar la extracción de DNA, con controles positivos y negativos.

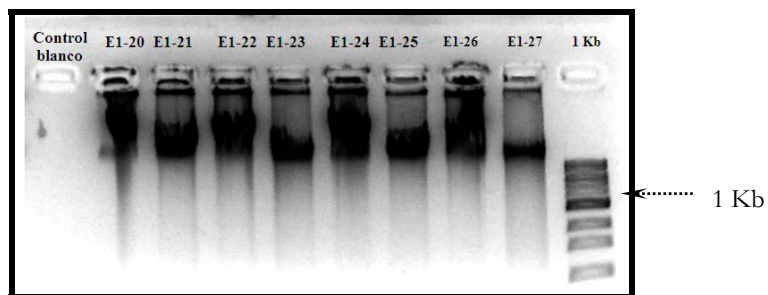


Figura 5. Foto en negativo de electroforesis de las extracciones 20 a la 27 de *C. acutus* y *C. moreletii* con controles positivo (en el primer carril a la izquierda) y negativo (en el último carril).

4.2 Amplificados

Se amplificaron y purificaron 62 muestras de ~540 bp, correspondientes a la primera mitad de la RCmt, dividida en los dominios I, II y parte del III. Un ejemplo del gel de agarosa utilizado para observar las bandas con base en el peso molecular del fragmento se muestra en la figura 6. El análisis de éste fragmento en geles a agarosa mostró la presencia de un producto de PCR con una talla esperada de aproximadamente 540 bp.

Las 62 secuencias de las dos especies se obtuvieron en ambos sentidos (forward y reverse). Una vez hecha la verificación de secuencias en el Sequencher 4.6 (Gene code, Ann Michigan) (figura 7). Se omitieron tres secuencias con cromatogramas poco claros, dos de *C. acutus* y uno de *C. moreletii*, obteniendo un total de 35 para *C. acutus* y 24 secuencias para *C. moreletii*.

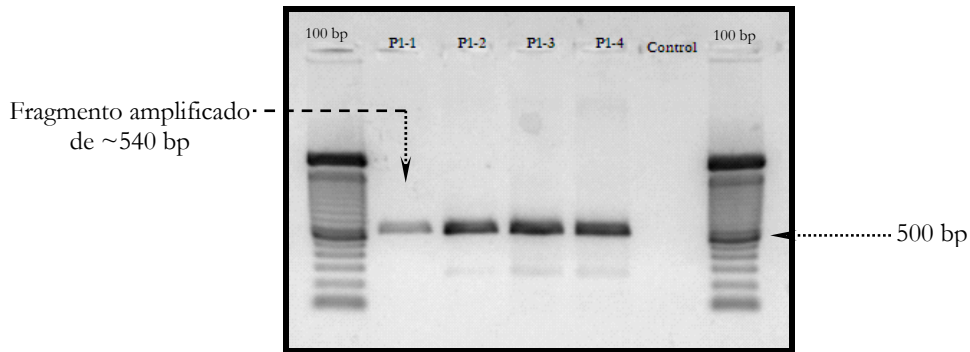


Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa del la primera mitad de la RCmt amplificado por PCR a partir de de *C. acutus* y *C. moreletii*. P1-1 a P1-4 indican el fragmento amplificado de aproximadamente 540 bp. Se muestran los controles positivo (en el primero y último carril) y negativo (Control).

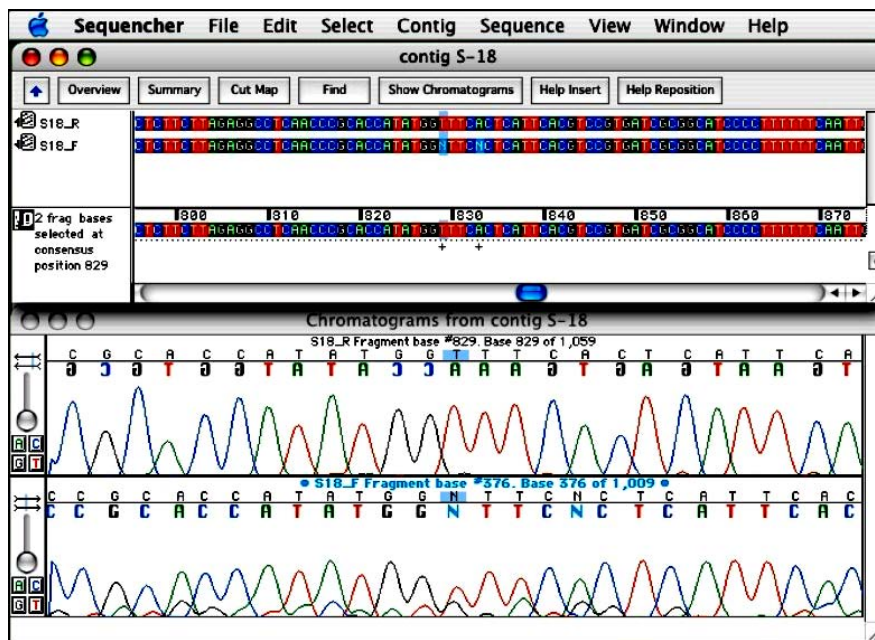


Figura 7. Programa Sequencher 4.6 (Gene code, Ann Michigan) para verificar secuencias. En la parte de arriba se muestran las secuencias forward, reverse y la secuencia consenso. Abajo se muestran los cromatogramas también de ambas direcciones.

4.3 Variación genética

Se encontraron dos haplotipos para *C. acutus*, el haplotipo ACU01 es el de mayor frecuencia con 33 individuos y se presenta en todas las localidades muestreadas. El

haplotipo ACU02 se encontró en dos individuos del sur de Oaxaca y Norte de Chiapas, con una sola sustitución en la base 369 correspondiente al dominio III. Los haplotipos y sus frecuencias se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Frecuencias de haplotipos para *C. acutus* en las diferentes localidades de México. Los números pequeños indican las muestras obtenidas por cada localidad. * OD - Origen desconocido. Las abreviaturas corresponden a las de la figura 1.

Haplotipos	Localidades muestreadas													
	ACA	ALC	EC	RVC	IX	LMZ	LP	MG	PA	PL	PV	VO	SU	OD*
	2	3	4	1	1	3	3	1	1	2	5	5	2	2
ACU01	2	3	4	1	1	3	3	1	-	2	5	4	2	2
ACU02	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-

En el caso de *Crocodylus moreletii*, se obtuvieron tres haplotipos en 24 muestras. El haplotipo MOR01 se encontró para 18 individuos y presentó la mayor frecuencia. El haplotipo MOR02 se encontró en un solo individuo del sur del estado de Chiapas y el haplotipo MOR03 se encontró en cinco individuos de Tamaulipas y del norte de Veracruz. En el haplotipo MOR02 se encontró una sola sustitución en la base 477 correspondiente al dominio II. En el haplotipo MOR03 se encontraron tres sustituciones en las bases 98 correspondiente al dominio I, 274 del dominio II y 487 del dominio III, las frecuencias de los haplotipos en las diferentes localidades se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Frecuencias de haplotipos para *C. moreletii* en México. Los números pequeños indican el tamaño de la muestra para cada localidad. *OD - Origen desconocido. Las abreviaturas corresponden a las de la figura 1.

Haplotipos	Localidades muestreadas									
	VH	CE	CH	ALC	TX	CM	GZ	VG	OD*	
	7	4	2	3	1	2	2	2	1	
MOR01	7	4	1	3	1	1	-	-	1	
MOR02	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
MOR03	-	-	-	-	-	1	2	2	-	

Todos los cambios nucleotídicos para los diferentes haplotipos de ambas especies fueron sustituciones y no se presentó ninguna inserción o deleción. Se encontró que, de las 5 sustituciones, 4 son transiciones (C-T, A-G y T-C⁽²⁾) y solo una es transversión (A-T). Las sustituciones se encontraron en los tres dominios, una en el dominio I, una en el dominio II y tres en el dominio III. Las diferentes sustituciones se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Sustituciones de los haplotipos de *C. acutus* y *C. moreletii* en México.

Especie	Haplotipo	Base y dominio	Base original	Sustitución	Tipo de sustitución
<i>C. acutus</i>	ACU02	369 III	C	T	Transición
<i>C. moreletii</i>	MOR02	98 I	A	G	Transición
<i>C. moreletii</i>	MOR02	274 II	T	C	Transición
<i>C. moreletii</i>	MOR03	477 III	T	C	Transición
<i>C. moreletii</i>	MOR02	487 III	A	T	Transversión

Dentro de la localidad de Alcuahue en Colima, donde se encuentran las dos especies, se observaron haplotipos puros para cada una de las especies. El fenotipo identificado corresponde con el genotipo perteneciente a cada especie. Por lo tanto no se observó evidencia de hibridación. Con fines de cualquier consulta, las secuencias completas para cada uno de los haplotipos se muestran alineados en el Apéndice A.

4.4 Diversidad genética

Para *C. acutus*, se obtuvo una diversidad haplotípica (h) de 0.1079 ± 0.0680 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.000200 ± 0.000372 . Para *C. moreletii* se obtuvo una diversidad haplotípica (h) de 0.4094 ± 0.1035 y una diversidad nucleotídica (π) de

0.002078 ± 0.001558. Por otra parte, los haplotipos más frecuentes de las dos especies presentaron una diferencia nucleotídica de 4.01%.

4.5 Relaciones de distancia

De acuerdo a Model Test (Posada y Crandall, 1998) se obtuvo que el mejor modelo para las secuencias obtenidas fue el HKY85 (Hasegawa *et al.*, 1985). De acuerdo con el árbol de distancia (Neighbor-joining) para los haplotipos encontrados en México se observa que *C. moreletii* se separa claramente de *C. acutus* y *C. intermedius* que se distribuye en el río Orinoco, en Venezuela. Estos dos últimos forman un clado, lo que pone a *C. intermedius* como grupo hermano de *C. acutus* de acuerdo al árbol de distancia. En la figura 8, se muestra el árbol correspondiente a los haplotipos únicos del presente trabajo junto con los sitios donde se presentan los diferentes haplotipos y grupos externos. *C. rhombifer* se distribuyen en Cuba y *C. niloticus* en gran parte de África.

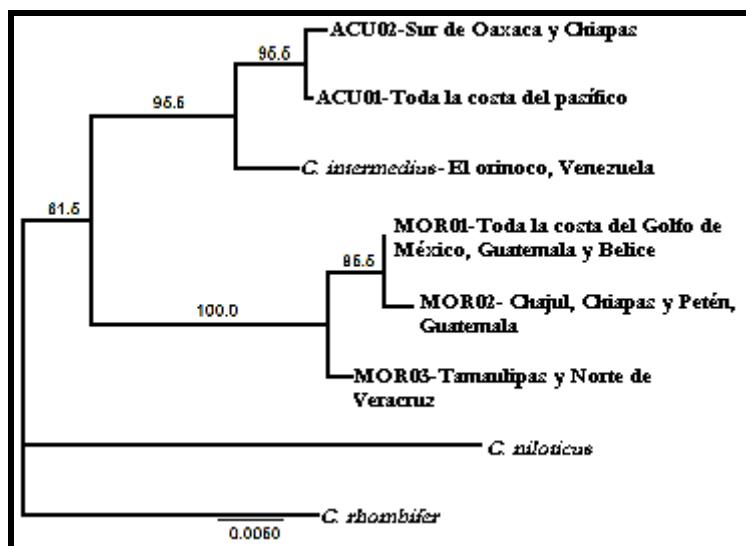


Figura 8. Árbol de distancia (Neighbor-joining) de haplotipos únicos y grupos externos con distribución. Se basa en el modelo HKY85. En la parte superior de los nodos se indican los valores de bootstrap (1000 réplicas).

Para los haplotipos de *C. moreletii*, se observa que el haplotipo MOR03 se presenta solo en el norte de México, el MOR02 se presenta en una sola localidad y el haplotipo MOR02 se encuentra solo en la localidad de Chajul, Chiapas para México y en la localidad de Petén, Guatemala (Ray *et al.*, 2004). El haplotipo MOR 01 se presenta desde el sur de Tamaulipas en Ciudad Madero hasta la localidad de Chajul en Chiapas en México así como en Guatemala y Belice, abarcando la gran mayoría de la distribución muestreada de *C. moreletii*, a excepción de dos localidades, Gutiérrez Zamora en el norte de Veracruz y la localidad más nortea de Vicente Guerrero, Tamaulipas.

El segundo árbol de Neighbor-joining (figura 9) construido para los haplotipos únicos del presente estudio y los del trabajo de Ray *et al.* (2004) nombrados de las letras A a la T en el caso de los haplotipos *C. moreletii*, destacan los haplotipos B, C, D y P que se introduce en el clado de los haplotipos *C. acutus*. (U-Cacu a Y-Cacu). Este resultado se interpretó como un haplotipo de *C. moreletii* tipo-*C. acutus*. También se observa una topología muy parecida al árbol presentado en el trabajo de Ray *et al.* (2004). V-Cacu se une al clado de *C. intermedius* que se sale del clado de los haplotipos *C. acutus*. Se destaca que los haplotipos encontrados en el presente trabajo se agrupan todos con la mayoría de los haplotipos ya encontrados en el trabajo de Ray *et al.* (2004) a excepción del haplotipo MOR03, que exclusivo para el norteste de México.

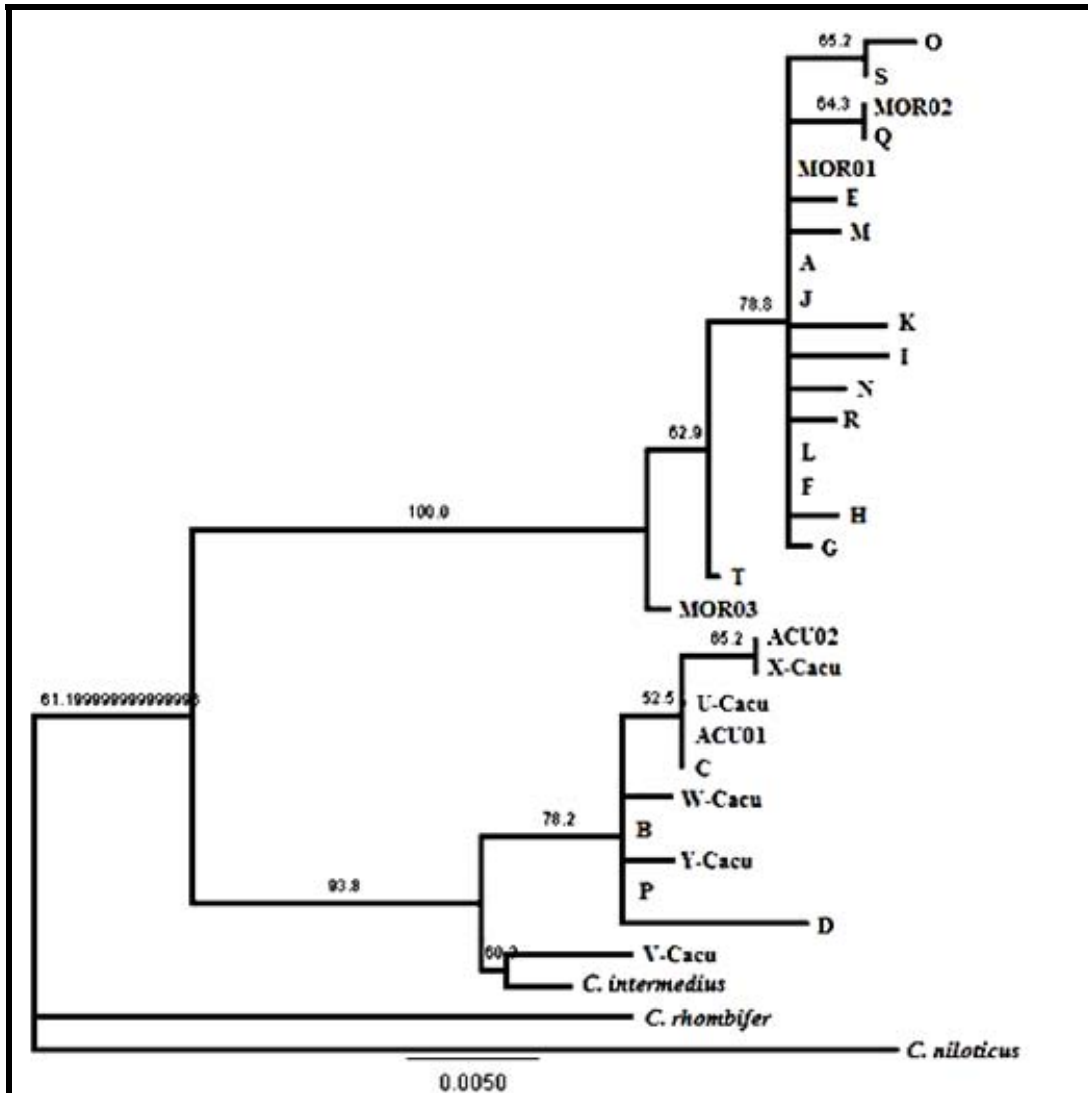


Figura 9. Árbol de Neighbor-joining basado en el modelo HKY85 de haplotipos únicos y grupos externos del presente estudio y del estudio realizado por Ray *et al.* (2004). En la parte superior de los nodos se indican los valores de bootstrap (1000 réplicas).

4.6 Relación haplotípica y su distribución geográfica

4.6.1 Relación *C. moreletii*

La red de haplotipos para *C. moreletii* de México, muestra tres haplotipos bien marcados, el haplotipo MOR01 es el que tiene mayor frecuencia, con 18 individuos,

después el MOR03 con 5 individuos y por último el MOR02 con un solo individuo de Chajul, Chiapas (figura 10).

En la figura 11 se muestra la correspondencia de los haplotipos con su distribución geográfica en cada localidad. El haplotipo MOR01 se distribuye en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas. MOR02 se encuentra solo en Chiapas y MOR03 se localiza en el norte de Veracruz y en Tamaulipas.

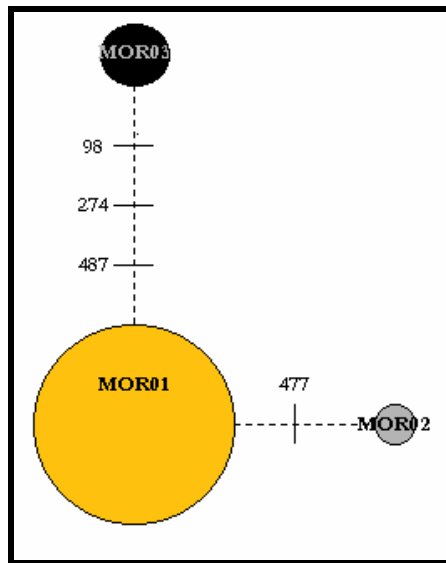


Figura 10. Red de haplotipos de *C. moreletii* en México. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que presenta el haplotipo.

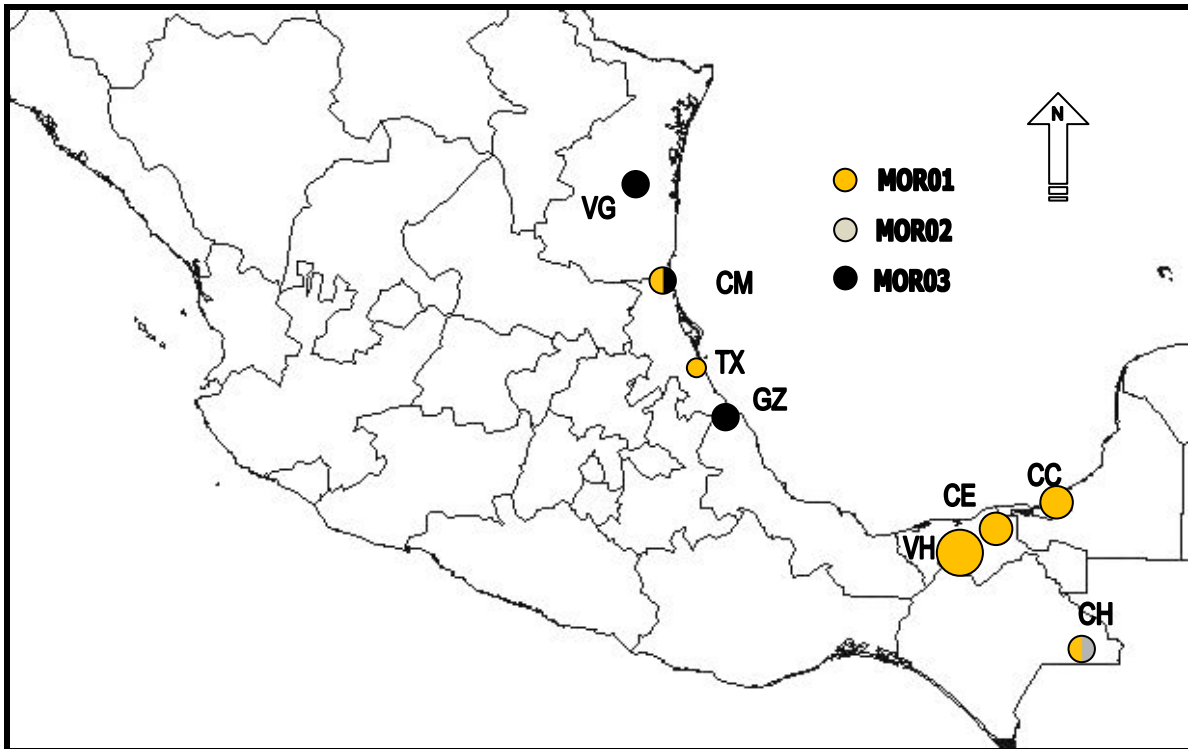


Figura 11. Distribución de los haplotipos de *C. moreletii* para haplotipos de México. El tamaño del círculo representa el número de muestra por localidad. Abreviaturas como en la figura 4.

La figura 12 muestra una gran diversidad de haplotipos para *C. moreletii* principalmente de la zona sur, correspondiente al estado de Chiapas, Guatemala y Belice. Se muestran los haplotipos del trabajo de Ray *et al.* (2004) con letras (E, F, H, J, K, L, M, N, O, R, S, T). Los haplotipos MOR01 y MOR02 corresponden a los haplotipos A y Q respectivamente, y nuevamente MOR03 aparece como exclusivo para México. Destaca que los únicos haplotipos que se presentan para más de un individuo son los 3 encontrados en México. Todos los demás son haplotipos que presenta un solo individuo.

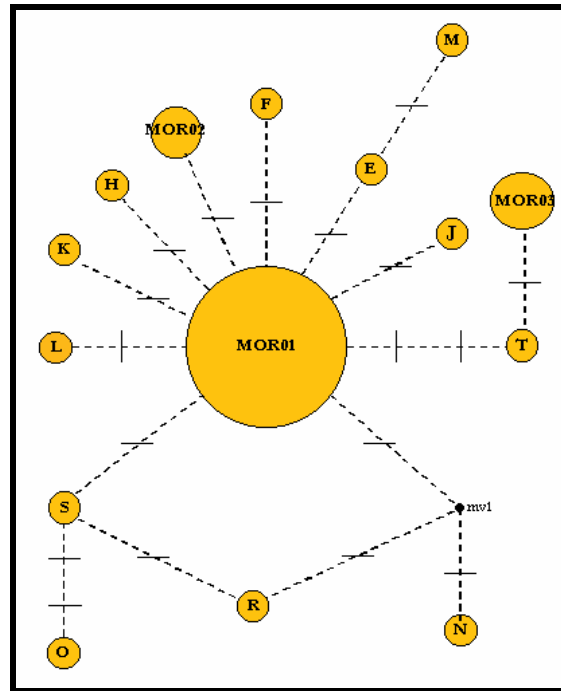


Figura 12. Red de haplotipos de *C. moreletii* para México, Guatemala y Belice. Las letras aisladas corresponden a los haplotipos de Ray *et al.* (2004).

4.6.2 Relación entre *C. acutus* y *C. moreletii*

La red de haplotipos mostrada en la figura 13 se hizo para todas las muestras obtenidas del presente trabajo. Se observa una clara separación entre *C. acutus* y *C. moreletii*, estas dos especies están separadas por 21 sustituciones. En la red se incluye el haplotipo de la especie *C. intermedius*. Esta especie está más cercana a los haplotipos de *C. acutus*, ya que solo los separan cuatro sustituciones mientras que 19 sustituciones *C. intermedius* se separa del haplotipo más cercano de *C. moreletii*. En la figura 14 se presenta la distribución de los cinco haplotipos encontrados en el presente trabajo y su distribución en México. El tamaño de los círculos representa el tamaño de muestra por población. Se observa la clara separación entre los dos haplotipos, ACU01 y ACU02 de *C. acutus* y los tres haplotipos, MOR01, MOR02 y MOR03 de *C. moreletii* en México.

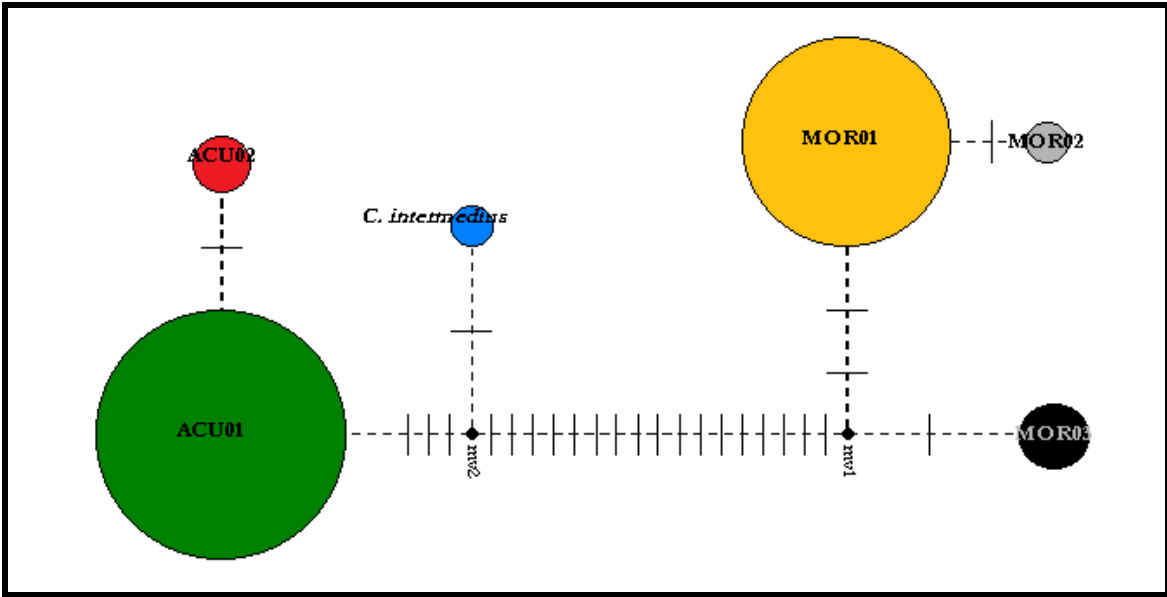


Figura 13. Red de haplotipos de *C. moreletii* en amarillo y *C. acutus* en verde para México, y *C. intermedius* en azul, los números sobre las líneas indican la posición de la sustitución de la base nitrogenada.

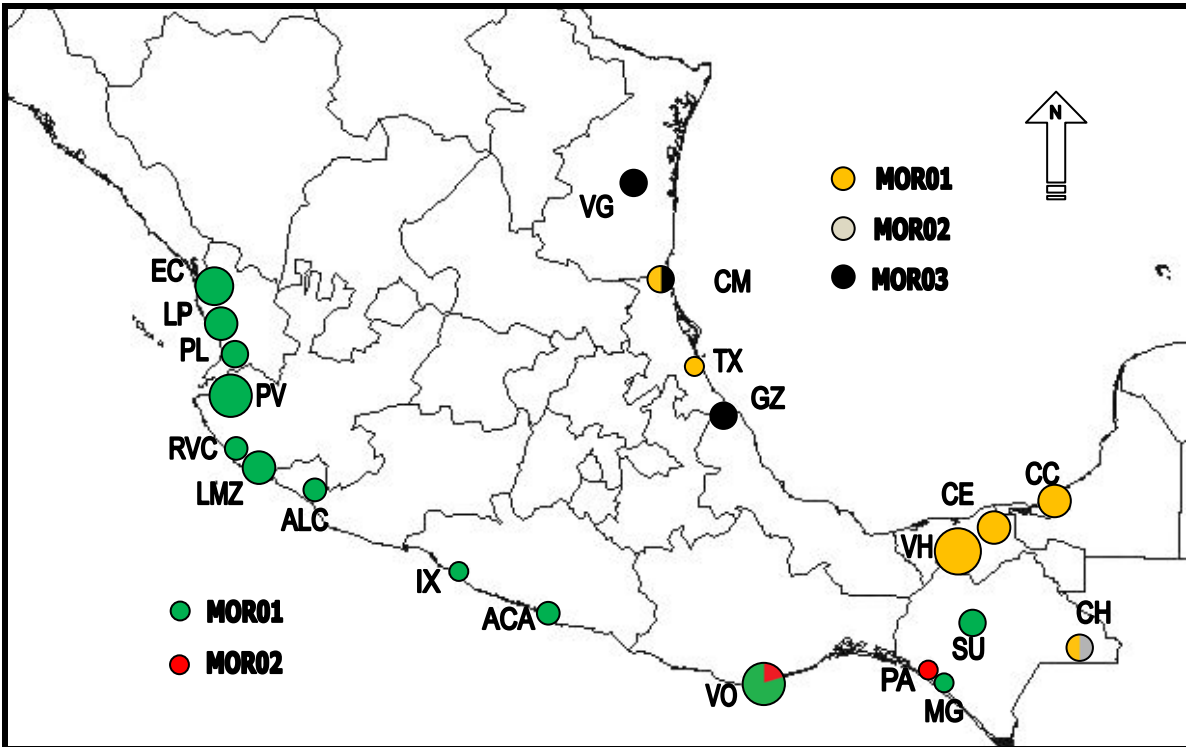


Figura 14. Muestra la superposición del mapa de México con los haplotipos para *C. acutus* y *C. moreletii* de presente estudio. Abreviaturas como en figura 4.

4.6.3 Relación *C. acutus* y tipo-*C. acutus*

La siguiente red de haplotipos (figura 15) se hizo para los haplotipos de *C. acutus* registrados en México y los haplotipos tipo-*C. acutus* obtenidos del artículo de Ray *et al.* (2004). Los haplotipos tipo *C. acutus* están reportados para 4 localidades en Belice. En la figura 16 se observa que el haplotipo ACU02 es exclusivo de México y los haplotipo ACUL01 y ACUL02 son exclusivos de Belice, mientras que el haplotipo ACU01 está representado en todo México y en la localidad de NRL de Belice.

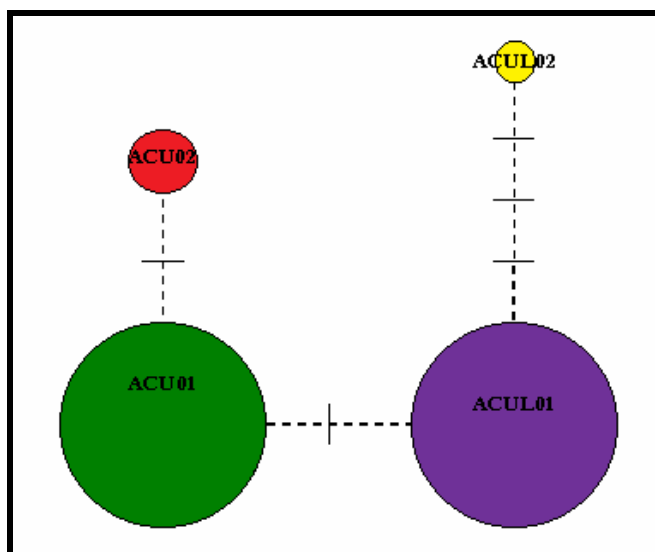


Figura 15. Red de haplotipos de *C. acutus* para México de México, representados por ACU01 y ACU02 tipo-*C. acutus* representados por ACUL01 y ACUL02 de Belice. Los las líneas muestran el número de sustituciones entre haplotipos.

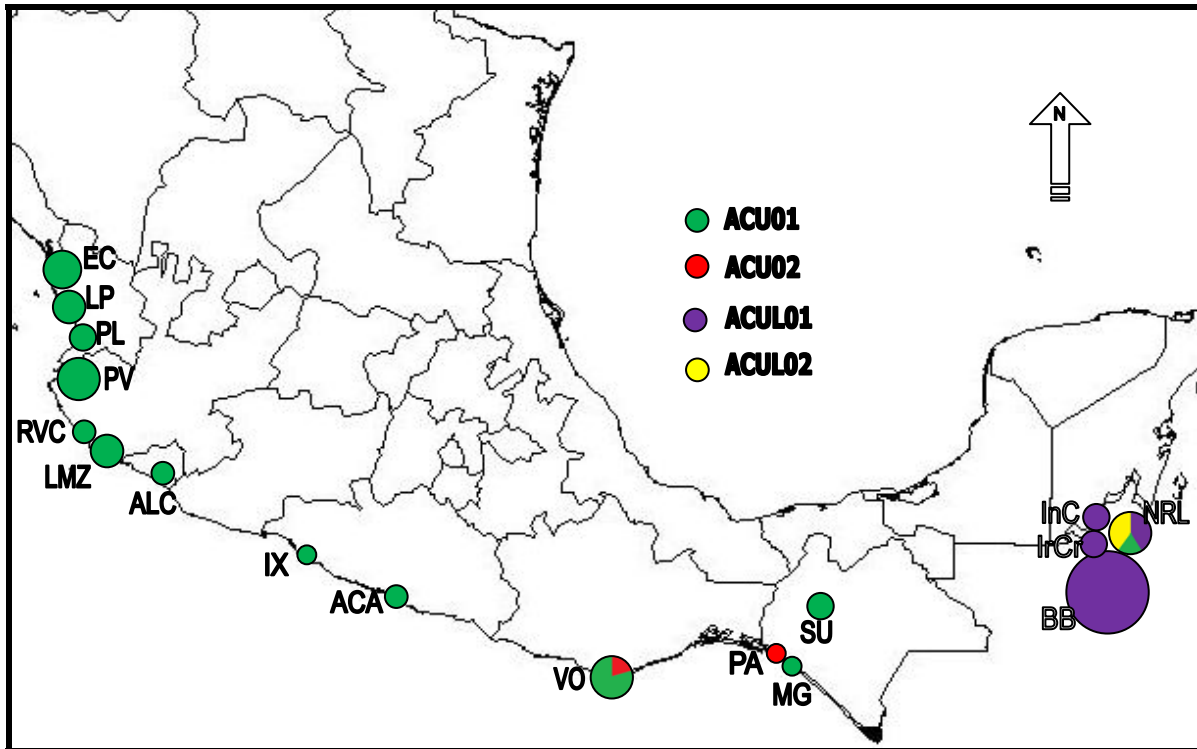


Figura 16. Muestra la superposición de los *C. acutus* y tipo-*C. acutus* de México y Belice. Abreviaturas como en figura 4; InC-Indian Creek, IrCr-Irish Creek, BB-Banana Bank y NRL-New River Lagoon.

4.7 Anidamiento de clados, relación *C. acutus*, *C. moreletii* y tipo-*C. acutus*

En la figura 17 se muestra el último anidamiento de clados hecho para *C. acutus*, *C. moreletii* y tipo-*C. acutus*. Se observa la separación de dos grandes grupos separados por 17 nodos. Los haplotipos tipo-*C. acutus* se vuelven a agrupar con los *C. acutus*.

Para la superposición de localidades con los haplotipos (figura 18) se observan una gran diversidad de haplotipos, en total 20, la mayor diversidad se observa dentro de las localidades de Belice.

En el cuadro 6 se observa la resolución a partir de la clave de Templeton, para la salida del GeoDis. En el primer nivel de anidamiento, correspondiente a los haplotipos, el clado 1-1 presenta flujo genético restringido con aislamiento por distancia, mientras que el clado 1-7 habla de una fragmentación alopática. En el segundo nivel de anidamiento, el

clado 2-1 se observa expansión del área de distribución contigua. El clado 2-3 presenta fragmentación seguida de una expansión del área de distribución y se confirma el movimiento por colonización a larga distancia. Por último, en el cladograma total se observa una expansión del área de distribución contigua.

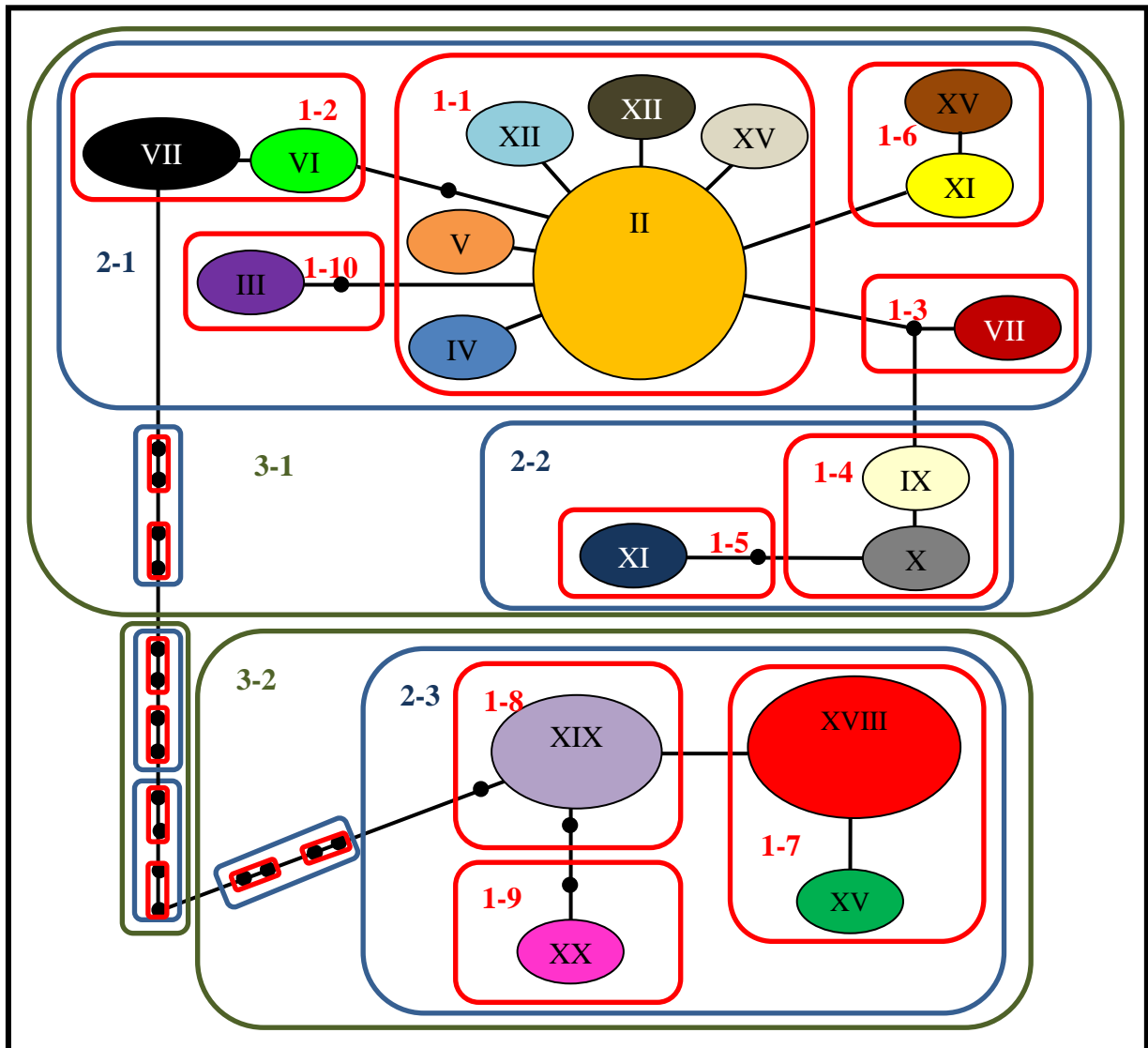


Figura 17. Anidación de clados de todos los haplotipos de *C. acutus*, *C. moreletii* y tipo-*C. acutus*. Los números romanos representan cada haplotipo y el tamaño del óvalo representa el tamaño de muestra. El anidamiento 3-1 agrupa a los *C. moreletii* y 3-3 agrupa a los *C. acutus* y tipo-*C. acutus*.

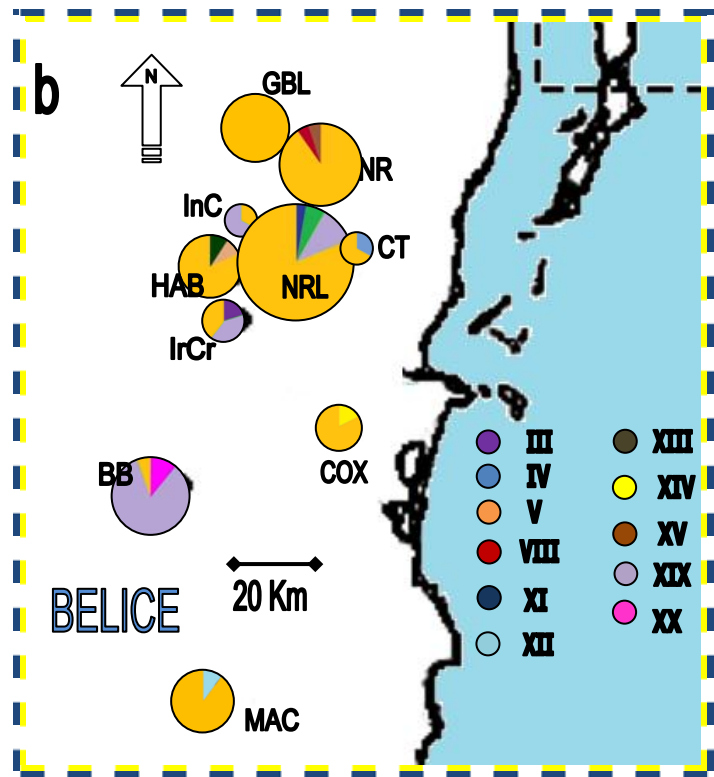
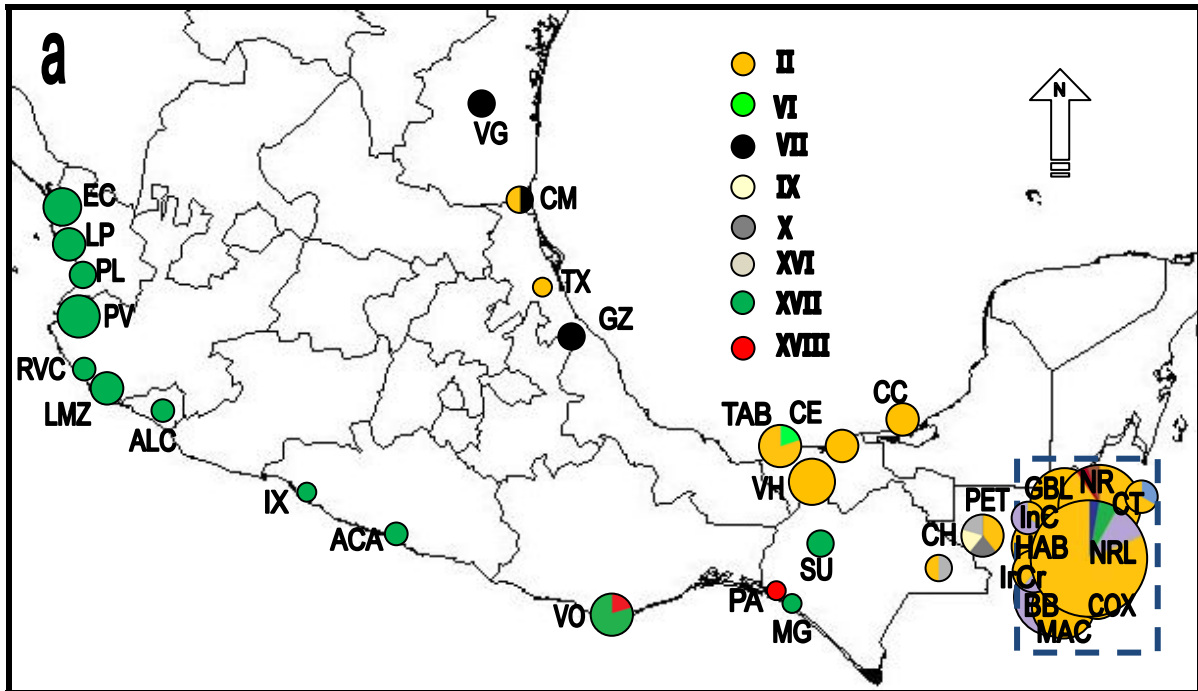


Figura 18. a) Superposición de la red de haplotipos de la figura 17; b) Detalle de Belice correspondiente al mapa de la figura 18a. Simbología y abreviaturas como en la figura 4 y figura 17; GBL- Lagoon, BB-Banana Bank Lagoon, Cox-Cox Lagoon, CT-Crooked Tree Wildlife Sanctuary, GBL-Gold Button Lagoon, Hab-Habanero Lagoon, IrCr-Irish Creek, InC-Indian Creek, Mac-Macal River, NR-New River, NRL-New River Lagoon, Pet-Peten, Guatemala, Tab-Tabasco, México.

Cuadro 6. Resultados obtenidos a partir de la clave de GeoDis para haplotipos de *C. acutus*, *C. moreletii* y tipo-*C. acutus* para México, Guatemala y Belice.

Clado	Serie en la clave de GeoDis	Resultado
1-1	1 – No – 2 – Sí – 3 – No – 4 – No	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia.
1-7	1 – No – 2 – Sí – 3 – No – 4 – Sí – 9 – No	Fragmentación alopátrica
2-1	1 – No – 2 – No – 11 – Sí – EAD – 12 – No	Expansión del área de distribución (EAD) contigua.
2-3	1 – No – 2 – Sí – 3 – Sí – 5 – No – 6 – Sí – 13 – Sí	Fragmentación seguida de una expansión del área de distribución
	21- Sí	Se confirma el movimiento por colonización a larga distancia.
Cladograma Total	1 – No – 2 – No – 11 – Sí – EAD – 12 – No	Expansión del área de distribución contigua.

5. DISCUSIÓN

Cada parte en el desarrollo de un trabajo científico es importante para tener certeza en los resultados. Los resultados son el procesamiento de los datos obtenidos. Así pues el análisis crítico y objetivo de los resultados es desarrollado para obtener el mayor beneficio posible. La discusión comienza con el análisis de la obtención y revisión de secuencias y continuando con los análisis de las partes desarrolladas en el método.

Una parte de suma importancia en el trabajo con secuencias tiene lugar en la verificación y corrección del formato ABI después de salir del secuenciador automático. Las secuencias deben ser revisadas minuciosamente, ya que cualquier error puede llevar a conclusiones equívocas. Después de revisar las secuencias del presente estudio se decidió eliminar 3 individuos que no presentaban claridad en los cromatogramas y por tanto había poca certidumbre para con algunos cambios de base. Una herramienta muy útil para dar fortaleza a los resultados fue el programa Sequencher 4.6 (Gene code, Ann Arbor, Michigan) que presenta ciertas ventajas. En primer lugar se puede observar los cromatogramas y las secuencias en ambas direcciones para formar la secuencia consenso (figura 4). De este modo, verificar las secuencias resulta una tarea fácil a diferencia de otros programas, como BioEdit (Hall, 1999) que cuando es usado para verificar secuencias, permite observar solo un cromatograma por ventana y no forma un consenso de las secuencias forward y reverse.

Para evaluar qué tan bien se hizo la verificación de las secuencias se contó el número y tipo de sustituciones. Como se observa en los resultados, los haplotipos encontrados en el presente trabajo presentan un número mayor de transiciones (cuatro) que de transversiones (una). Al analizar los haplotipos de *C. moreletii* del trabajo de Ray *et al.* (2004) se detectaron 16 sustituciones con una frecuencia menor de transiciones (7) que de

transversiones (9) y también se detectaron cuatro *indels* (incersiones/delecciones). Esto se contrapone a la probabilidad normal de que se presente una transición o una transversión. En el caso de DNA mitocondrial la tasa de transiciones puede ser hasta un orden de magnitud mayor que la tasa de transversiones (Yang, 1996; Hedrick, 2000)

El alineamiento también juega un papel muy importante a la hora de hacer inferencias. Para los haplotipos encontrados en el presente estudio la variación intraespecífica solo presentó sustituciones (cuadro 6) y entre las dos especies se presentaron 20 transiciones y solo 2 *indels* (de una base cada uno), por lo que el alineamiento se pudo hacer sin problemas (Apéndice A).

5.1 Diversidad nucleotídica y haplotípica

Se observó un bajo nivel de variación en ambas especies a lo largo de su distribución en México con más de 1100 Km para *C. moreletii* y más de 1400 Km para *C. acutus*. Esto concuerda con los resultados obtenidos para la variación nucleotídica observada en *Alligator mississippiensis* (Glenn *et al.*, 2002).

Para *C. acutus* se obtuvo una diversidad haplotípica (h) de 0.1079 ± 0.0680 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.000200 ± 0.000372 . Esto se debe a que *C. acutus* para México, presenta únicamente un haplotipo distinto en las poblaciones de Ventanilla, Oaxaca y Puerto Arista, Chiapas. La variación en esta especie es incluso menor a *C. moreletii* en la que se obtuvo una diversidad haplotípica (h) de 0.4094 ± 0.1035 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.002078 ± 0.001558 , aunque comparativamente con otros estudios no es tan bajo como se muestra en el cuadro 7. A pesar de que *C. acutus* tienen una distribución mucho más amplia que *C. moreletii*. Se sabe que *C. acutus* puede desplazarse largas distancias incluso por mar (Álvarez del Toro y Sigler, 2001). La migración de

individuos entre las poblaciones hace que la variación disminuya provocando una homogeneidad genética (Hillis, 1996; Avise, 1994, 2000; Hedrick, 2000; Primack *et al.*, 2001).

Para hablar de un parámetro y afirmar que significa baja diversidad haplotípica y nucleotídica, es necesario tener referencias acerca de qué es un parámetro alto, por lo que en el cuadro 7 se presentan una serie de resultados obtenidos para otros trabajos y para otros grupos de reptiles. *A. mississippiensis* y *C. moreletii* presentan bajos niveles de diversidades tanto haplotípica como nucleotídica; mientras que en las serpientes *Hemorrhoids hippocrepsis* y *Malpolon monspessulanus*, la tortuga de las Galápagos *Geochelone nigra* y una lagartija de Florida *Sceloporus woodi* se observa un altos niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica.

Cuadro 7. Comparación de parámetros h y π para otras especies.

Especies	Tamaño de muestra	Diversidad haplotípica (h)	Diversidad nucleotídica (π)	Referencia
<i>Hemorrhoids hippocrepsis</i>	20	0.815 ± 0.070	0.00875 ± 0.0054	<i>Carranza et al.</i> , 2006
<i>Malpolon monspessulanus</i>	11	0.727 ± 0.144	0.00630 ± 0.0043	<i>Carranza et al.</i> , 2006
<i>Geochelone nigra</i>	17	0.89 ± 0.04	0.006 ± sin datos	<i>Coifi et al.</i> , 2006
<i>Sceloporus woodi</i>	36	0.71 ± sin datos	0.005 ± sin datos	<i>Clark et al.</i> , 1999
<i>C. moreletii</i> , Belice	140	0.251 ± 0.055	0.00072 ± 0.00073	<i>Ray et al.</i> , 2004
<i>A. mississippiensis</i>	25	0.313 ± 0.332	0.00024 ± 0.00028	<i>Glenn et al.</i> , 2002
<i>C. moreletii</i> , México	24	0.409 ± 0.103	0.00207 ± 0.00155	Este trabajo
<i>C. acutus</i> , México	33	0.107 ± 0.068	0.00020 ± 0.00037	Este trabajo

Intuitivamente, una población con bajos niveles de h y π puede haber experimentado un grave o prolongado cuello de botella en tiempo reciente. En cambio, altos valores de h y π son una firma esperada para una población estable con un gran tamaños efectivo poblacional (Avise, 2000). Estudios recientes sugieren que los cocodrilianos sufrieron una grave reducción en sus poblaciones, provocando un cuello de botella cuyos efectos se

pueden ver reflejados en la presente homogeneización del mtDNA (Glenn *et al.*, 1998; Dever *et al.*, 2002). Tampoco se puede dejar del lado que los cocodrilos se han mantenido sin cambios grandes en la Tierra durante mucho tiempo posiblemente a causa de una baja tasa de mutación en los genomas (Field *et al.*, 1988; Li y Graur, 2000).

5.2 Distancia genética

Para los árboles obtenidos exclusivamente para México, se observa una clara separación entre las dos especies. Para *C. moreletii* se observa un haplotipo (MOR03) que se distribuye desde el norte de Veracruz hasta Tamaulipas. Sin embargo, en este estudio no se tienen muestras de las poblaciones del centro de Veracruz y de la península de Yucatán.

En el caso de *C. acutus*, se obtuvieron dos haplotipos, el primero ACU01 se encuentra en todo el país, y el segundo ACU02 se encontró únicamente en dos localidades, Ventanilla, Oaxaca y Puerto Arista, Chiapas. Ambos haplotipos se encuentran reportados en el trabajo de Ray *et al.* (2004).

En el árbol del presente trabajo que incluye todos los haplotipos únicos, tanto los de Belice, Guatemala y México (figura 9), se observan dos haplotipos que no se presentan en el trabajo de Ray *et al.* (2004). El haplotipo P correspondiente a un individuo tipo-*C. acutus* y el haplotipo MOR03 corresponde organismos al extremo norte de la distribución de *C. moreletii*. El encontrar un haplotipo nuevo para el extremo norte de la distribución es debido a que las poblaciones que se encuentran en los extremos de la distribución de la especie constituyen valiosos componentes de la diversidad biológica (Primack *et al.*, 2001). Así pues no sería raro encontrar un haplotipo exclusivo para la distribución sur de *C. moreletii*.

Los otros 4 haplotipos registrados para México corresponden a haplotipos ya observados en el trabajo de Ray *et al.* (2004). Para *C. moreletii* el haplotipo MOR01 corresponde al haplotipo A, el haplotipo MOR02 corresponde al haplotipo Q. Para *C. acutus* el haplotipo ACU01 corresponde al haplotipo C y ACU02 al X-Cacu3465TonMex. Por la terminación del catálogo del individuo se infiere que es un individuo de México, lo que haría este haplotipo exclusivo de México.

Al igual que lo reportado en otros trabajos (Ray y Densmore, 2002; García, 2004) *C. intermedius* se ubica como grupo hermano de *C. acutus*. Para las redes de haplotipos se observa que para los *C. moreletii* de México, se separa nuevamente MOR03 con radical importancia, 5 individuos presentan este haplotipo.

Para los haplotipos *C. moreletii* del D al T en Belice se presentan con una frecuencia de un individuo, a pesar del número grande de muestras en cada localidad. En cambio los haplotipos mexicanos se observan con una frecuencia mínima de dos. A pesar de que el haplotipo MOR02 encontrada en Chajul, Chiapas con un solo registro, se presenta también en un individuo, en Petén Guatemala, correspondiente al haplotipo Q y que coincide con la cercanía de ambas localidades. En el caso de los haplotipos *C. moreletii*, se observa que los únicos haplotipos con frecuencia mayor a 1 son MOR01, MOR02, MOR03, lo que habla de una buena identificación de los haplotipos

5.3 Variación haplotípica y correspondencia con la geografía

La red de haplotipos de *C. moreletii* de México separa tres haplotipos constantes que aparecen en el árbol de distancia. En la correspondencia de los haplotipos con la geografía se ve una separación entre el haplotipo MOR01 que se distribuye en casi todo el

territorio con los haplotipos MOR02 (que está en el extremo sur) y MOR03 (que se encuentra en el extremo norte).

Para las redes de *C. acutus* y *C. moreletii* se observa una clara separación de las dos especies con una longitud de 21 pasos mutacionales; incluso se observa en la figura 13 que *C. intermedius* se encuentra a cuatro pasos mutacionales de *C. acutus* y a 18 de *C. moreletii*. En la figura 14 se observa nuevamente separación de las dos especies y la distribución del haplotipo ACU01 en casi todo el Pacífico mexicano y las dos poblaciones con el haplotipo ACU02 al norte de Chiapas y al sur de Oaxaca. Se deben fortalecer los esfuerzos de conservación para las poblaciones de *C. acutus* con el haplotipo ACU02 exclusivo para México.

Crocodylus moreletii habita humedales y cuerpos de agua dulce a lo largo de la planicie costera del golfo de México, e incluyen localidades en estados que no tocan costa como Nuevo León, Querétaro y San Luis Potosí, y localidades de occidente con vertientes hacia el golfo de México como Chiapas y Oaxaca (Domínguez-Laso, 2005). Es importante mencionar que para Nuevo León, Querétaro y San Luis Potosí no hay ningún tipo de estudio genético, por lo que es de suma importancia comenzar a trabajar en estas localidades, en especial en las poblaciones que se encuentran en cañadas enclavadas en la sierra que pueden tener aislamientos importantes debido a la poca accesibilidad e hipotéticamente ofrecen un incremento importante en la diferenciación genética.

Se intentó hacer una asociación de los haplotipos *C. acutus* pero los dos haplotipos presentes en México no son suficientes para hacer una red de haplotipos. Pero se pudo hacer una para los haplotipos de *C. acutus* y tipo-*C. acutus*, donde se observa nuevamente un haplotipo exclusivo para México ACU02, dos haplotipos exclusivos para Belice

ACUL01 (tipo-*C. acutus*) y ACUL02. El haplotipo ACU01 se encuentra en todo México y en la localidad de New River Lagoon en Belice.

5.4 Patrones históricos de *Crocodylus* en México a partir del NCPA

Se estudiaron los patrones históricos en las poblaciones de dos especies del género *Crocodylus* estadísticamente significativos. Estos resultados se localizaron en varios niveles, los cuales indican el número de pasos mutacionales que agrupan a los haplotipos, y por lo tanto, cuanto mayor es el nivel de anidamiento, agrupa un número mayor de haplotipos y de individuos. Los sucesos detectados en los niveles altos son más antiguos que en los niveles bajos lo que permite reconstruir la historia de las especies.

En el nivel más antiguo que se pudo inferir (figura 19a), se observa una expansión en el área de distribución contigua, reflejando que cuando llegaron los cocodrilos a Mesoamérica, probablemente desde el sur, comenzaron a dispersarse a lo largo del territorio habitable.

En el segundo nivel de anidamiento, dos resultados fueron significativos. En el primero se incluyen haplotipos de *C. acutus* y tipo-*C. acutus* (figura 19b) en los cuales se observa una antigua colonización de larga distancia posiblemente conectada con fragmentación subsecuente hacia la zona de Belice, lo que coincide con la teoría de Ray *et al.* (2004), donde *C. acutus* llegó desde la costa, pudiendo hibridar antes y luego llegar a Belice. Para el clado de los *C. moreletii* (figura 19c) se muestra una expansión del área de distribución contigua. A partir del haplotipo nodal que se encuentra en casi todas las localidades se comienza la expansión del área de distribución se observa hacia las localidades de Belice y el norte de México.

En el primer nivel de anidamiento, que explica los eventos en el históricos más reciente para el clado *C. acutus* se observa una fragmentación alopática (figura 19d), indicando una clara diferenciación en las poblaciones que se encuentran en Oaxaca y el norte de Chiapas, las cuales deben ser conservadas y continuar con su estudio.

Para *C. moreletii* (figura 19d) se observó flujo génico restringido con aislamiento por distancia, confirmando la hipótesis de una diferenciación geográfica entre los distintos haplotipos al aumentar el área de muestreo. A pesar de que la diversidad genética no fue muy alta, sí es mayor que en otros trabajos e incluso que en *C. acutus*. Sin embargo, es importante para trabajos subsecuentes evaluar toda el área de distribución de *C. moreletii* incluyendo a la península de Yucatán e incluir muestras del sur de Veracruz. El aislamiento por distancia también le suma importancia a las localidades en los extremos de distribución de *C. moreletii*.

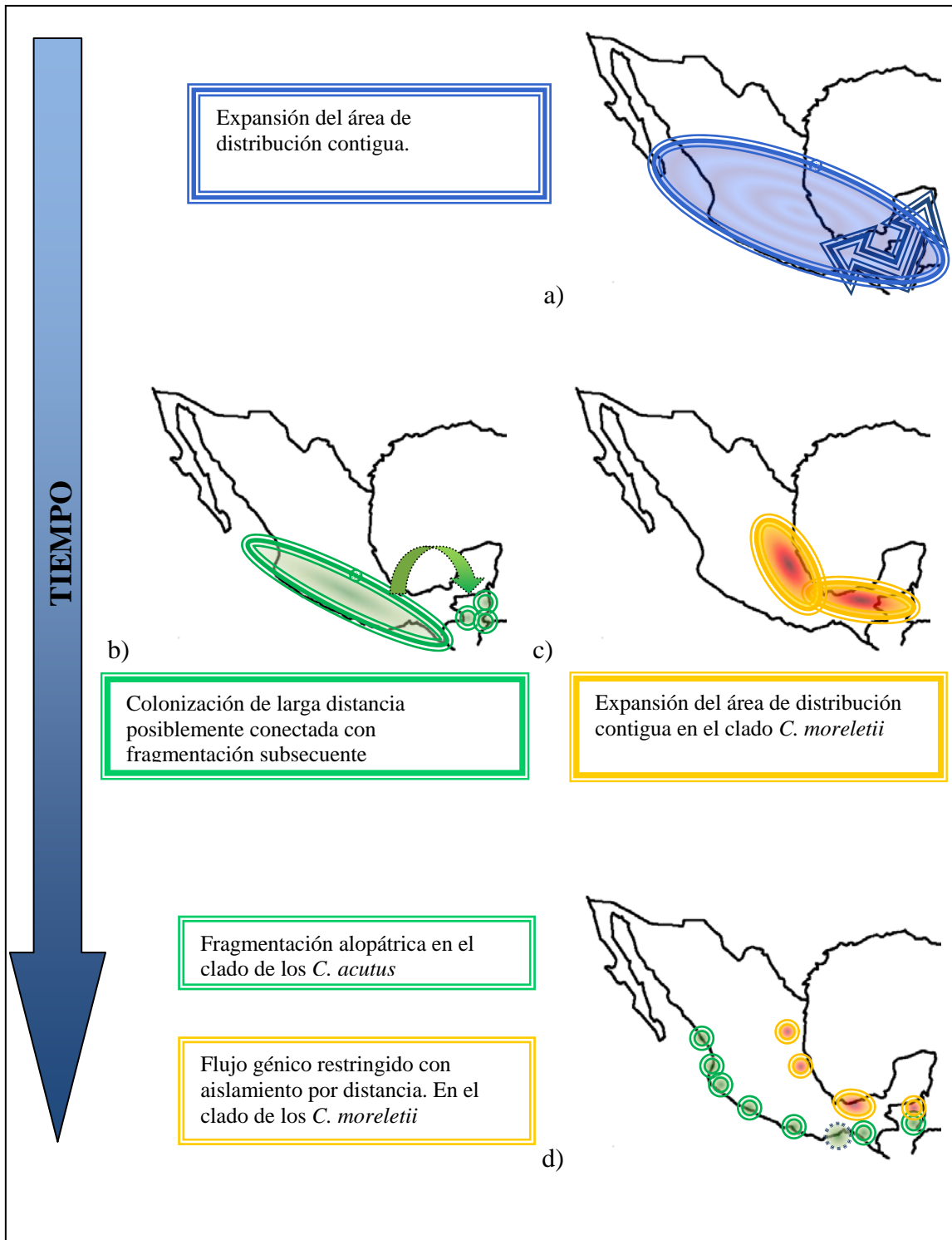


Figura 19. Interpretación espacio temporal de las relaciones geográficas en los clados de cocodrilos en México.

5.5 La naturaleza del mtDNA para las poblaciones evaluar puras e hibridación

Para evitar dificultades en la interpretación de los resultados también es importante la determinación taxonómica de los individuos. Es indispensable contar con archivos fotográficos para revisiones posteriores en caso de resultados contradictorios. En el trabajo de Ray *et al.* (2004) se habla de una posible mala identificación de los individuos muestreados, en especial de la localidad de Banana Bank donde se encuentra una población que tiene únicamente haplotipos tipo-*C. acutus*. Este resultado no puede ser verificado debido a que las fotos no sirven para determinación y solo algunos de los llamados híbridos pudieron ser definidos (Ray *et al.*, 2004).

Es importante aclarar que la naturaleza del genoma mitocondrial provee ciertas restricciones para evaluar situaciones específicas de hibridación. Para afirmar que la hibridación se lleve a cabo en la naturaleza, se necesitan evidencias fehacientes de que ésta ocurre; por ejemplo: con observación directa. Esto es que se observe a una hembra y un macho de cada especie copulando y verificar que la puesta sea viable.

En el caso de no observar la copula directa y el resultado de la puesta, se puede llegar a una hipótesis de hibridación mediante la evaluación de la morfología de los individuos, observando patrones fenotípicos que coincidan con las de ambas especies pero que no sean la regla de una en particular, lo que se conoce como fenotipo atípico. Sin embargo, la herencia uniparental (materna) y ausencia de recombinación del genoma mitocondrial, provoca una transgresión en el genoma, por lo que éste será idéntico (clonal) al de la especie madre (en el sentido estricto). Por lo anterior, el mtDNA es limitado para observar una evaluación real de hibridación, con lo que ésta evaluación se queda como una hipótesis de hibridación si no se conoce a ambos padres

En el presente trabajo se contó con una localidad donde se encuentran las dos especies en el estado de Colima, la laguna de Alcu zahue, donde *C. moreletii* fue introducido en 1985 con fines de cría intensiva en cautiverio. Se cree que *C. moreletii* ha desplazado a *C. acutus* localmente (Loa-Loza com. pers.), también se observa que *C. acutus* presenta patrones fenotípicos atípicos (en los osteodermos nucales) lo que hace pensar en indicios de hibridación, que debe ser evaluada con algún marcador nuclear en futuros estudios. No obstante, los genotipos mitocondrial de *C. acutus* corresponden al haplotipo más frecuentes en la especie, ACU01. También las tres muestras de *C. moreletii* presentan el haplotipo más común de la especie, MOR01. Por lo anterior, se pueden considerar dos hipótesis. En la primera, las especies están bien diferenciadas en esta localidad, existiendo una posible exclusión competitiva donde las dos especies se estén segregando. La segunda plantea que *C. moreletii* hibridó con *C. acutus*. De esta manera, los individuos con haplotipos tipo-*C. acutus* tienen madres *C. acutus*. Aunque esta última hipótesis es muy débil debido a la correspondencia de fenotipo identificado con el genotipo propio de cada especie.

Para el resto de las localidades muestreadas y los individuos colectados en cautiverio, donde su procedencia es desconocida, la diferenciación de las dos especies para México es clara. Este resultado sugiere que las poblaciones son genéticamente “puras” y es importante remarcar lo que sugiere Ray *et al.* (2004), que las poblaciones “puras” demandan ser protegidas enérgicamente.

El uso de otros marcadores, probablemente nucleares podría evaluarse si la hibridación existe realmente. Se debe poner especial atención en muestrear los animales con fenotipos atípicos. Aún así, es necesario realizar un trabajo exclusivamente para caracterizar la hibridación entre *C. acutus* y *C. moreletii* con base en parámetros

morfológicos, genéticos (con marcadores adicionales), de compatibilidad reproductiva y de viabilidad de la descendencia.

Según Ramos (2006), la hibridación puede ser vista como una amenaza latente hacia las especies de cocodrilo, en este caso para *C. acutus* y *C. moreletii*, debido a que traería como consecuencia la pérdida de la integridad genética en cada especie y su posible desaparición como tales. Sin embargo, sometiendo a prueba el concepto de especie de cohesión, estas dos especies se han mantenido a lo largo del tiempo separadas gracias al mantenimiento de los mecanismos cohesivos. Los más evidentes son: que cada una presenta una época de cortejo y nidación específicas. El hábitat es un componente importante (ver cuadro 1), de hecho cada una ocupa un nicho distinto, mientras que *C. acutus* es influenciado por componentes de temperatura, *C. moreletii* se basa mayormente en un componente de precipitación (Ávila, 2006). Lo anterior es un llamado para el análisis profundo de ¿qué tan latente es la amenaza de pérdida de diversidad específica en las especies de cocodrilos?

1. CONCLUSIONES

- Al evaluar los primeros dos dominios de la región control y parte del dominio tres, en un total de 548 pares de bases, *C. moreletii* presenta un bajo nivel de diversidad haplotípica y nucleotídica para su distribución en México.
- *C. acutus* presenta un muy bajo nivel de variación nucleotídica y haplotípica para su distribución en México, más bajo que el de *C. moreletii*.
- Este bajo nivel de diversidad puede deberse a de un prolongado cuello de botella resultando en una homogeneidad del mtDNA en ambas especies.
- Doce poblaciones muestreadas para *C. acutus* se encuentran con haplotipos puros. Ya que el fenotipo específico coincide con el genotipo. Para estas poblaciones se deben redoblar esfuerzos para la protección y continuar con los estudios.
- Todas las poblaciones para *C. moreletii* presentan haplotipos puros
- En las localidades mexicanas muestreadas, *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii* se encuentran separados.
- El análisis filogeográfico de clados anidados permitió hacer inferencias acerca de la historia del linaje *Crocodylus* usando la región control de la mitocondria como marcador.
- La RCmt nos puede ofrecer una serie de respuestas a preguntas como evaluar la filogenia de los cocodrilianos (Ray y Densmore, 2002; García, 2004) o la introgresión de genomas en el caso de hibridación. Sin embargo, un marcador con una mayor tasa de mutación sería más apropiado para evaluar la diversidad genética intraespecífica de *C. moreletii* (Ray et al. 2004) y de *C. acutus*.

- En el análisis filogeográfico se observó un flujo génico restringido con aislamiento por distancia en *C. moreletii*. Confirmando la hipótesis de una diferenciación geográfica entre los distintos haplotipos al aumentar el área de muestreo.
- *C. moreletii*, muestra una diferenciación significativa en las poblaciones del extremo norte de su distribución en el haplotipo MOR03, que se distribuye a partir del norte de Veracruz hasta Tamaulipas y se debe buscar si llega aún más al sur de Veracruz, muestreando esas poblaciones.
- *C. acutus* en la actualidad presenta una fragmentación alopátrica en el NCPA por lo que se espera que las poblaciones hacia el resto de su distribución presenten diferencias significativas con las poblaciones de México.
- Los haplotipos MOR03 y ACU02 solo se han registrado en México, lo que les suma importancia de conservación a las poblaciones que presentan estos haplotipos. Las localidades en las que se observó MOR03 son Gutiérrez Zamora, Veracruz, Puerto Madero y Vicente Guerrero, Tamaulipas, y ACU02 en Ventanilla, Oaxaca y Puerto Arista, Chiapas.
- Para próximos estudios se deben incluir sitios donde no hay ninguna colecta y a lo largo de la distribución de las dos especies, incluyendo Centroamérica, el Caribe y Sudamérica para *C. acutus*.
- La población de Alcuahue donde coexisten ambas especies contiene genotipos que coinciden con el fenotipo propio para cada especie, por lo que no hay evidencia de hibridación.
- Es necesario realizar un trabajo exclusivamente para caracterizar la hibridación con base en morfología, genética y compatibilidad reproductiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. X., Herrera, J., Merchant, L. H. y A. G. Casas.** 1998. Efectos de la temperatura de incubación sobre la actividad esteroidogénica en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*. *Revista de la Sociedad Mexicana Historia Natural*. 48:95-103.
- Aguilar, M. X., Ballesteros, C. y A. G. Casas.** 2005. Distribución actual y potencial, impacto del cambio climático global y conjeturas sobre algunos de sus efectos en las especies de cocodrilos de México. Memorias del VII Congreso Latinoamericano de Herpetología. Cuernavaca, Morelos. México.
- Álvarez del Toro, M.** 1974. *Los Crocodylia de México*. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables.
- Álvarez del Toro, M y L. Sigler.** 2001. *Los Crocodylia de México*. 1ª edición. IMERNAR, PROFEPA. México.
- Alderton, D.** 2004. *Crocodiles and Alligators of the World*. Nueva York. EUA.
- Amos, W. y A. Balmford.** 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*. 87:257-265.
- Ávila, C. J.** 2007. *Análisis de la distribución de la familia Crocodylidae en México y los efectos del cambio climático*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Avise, J. C.** 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall. New York.
- Avise, J. C.** 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y A. Röhl.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.
- Barris, Q. G., Rodríguez, R. F. y A. G. Casas.** 2005. Modelo de crecimiento en crías de *Crocodylus moreletii* en Tabasco México. Memorias del VII Congreso Latinoamericano de Herpetología. Cuernavaca, Morelos, México.
- Bartholomew, G.A. y J. W. Hudson.** 1961. Ardillas terrestres del desierto. Pp. 147-154, en: *Ecología, Evolución y Biología de Poblaciones*. Selección de artículos de *Science*. Omega (1978), Barcelona.

- Begon, M., Townsend, C. R. y J. L. Harper.** 2006. *Ecology, from individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing. UK.
- Brazaitis, P., Madden, R., Amato, G., Rebelo, G. Yamaxhita, C., y M. E., Watanabe.** 1997. The South American and Center American caiman (*Caiman*) complex. *Special Report to the United States Fish and Wild life Service*.
- Carranza, S., Arnold, E. N., y J. M. Pleguezuelos.** 2006. Phylogeny, biogeography, and evolution of two Mediterranean snakes, *Malpolon monspessulanus* and *Hemorrhois hippocrepis* (Squamata, Colubridae), using mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:532-546.
- Casas, A. G.** 2002. Hacia la conservación y manejo sustentable del lagarto o cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México, 27-54, en: *La Conservación y el Manejo de Caimanes Y Cocodrilos de América Latina Volumen 2*. Luciano M. Verdade y Alejandro Larriera (eds.) La Región, Fundación Banco Bica, Santo Tomas, Santa Fe, Argentina.
- Casas, A. G.** 2003. Ecología de la anidación de *Crocodylus acutus* (Reptilia: Crocodylidae) en la desembocadura del río Cuitzmala, Jalisco, México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 88:111-128.
- Casas, A. G. y M. G. Guzmán.** 1970. *Estado actual sobre cocodrilos mexicanos*. Comisión Nacional Consultiva de Pesca. México.
- Casas, A. G.** 1995. Los cocodrilos de México como recurso natural. Presente, pasado y futuro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 46:153-162.
- Casas, A. G. y A. Rogel.** 1989. Observaciones sobre los nidos y las nidadas de *Crocodylus moreletii* en México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM. 13(1):323-330.
- Casas, A. G. y T. Reyna.** 1994. Climate and distribution of *Crocodylus acutus* in the Mexican pacific coast. *Biogeographica*. 70(2):69-75.
- Casas, A. G. y Q. G. Barrios.** 1997. Nuevos aportes a la anidación (1990-1993) de *Crocodylus moreletii* en cautiverio en Tabasco, México. Memorias de la 4ª Reunión Regional del Grupo de Especialistas en Cocodrilos de América Latina y el Caribe. UJAT. Villahermosa, Tabasco, México.

- Casas, A. G. y Q. G. Barrios.** 2003. Hábitos alimenticios de *Crocodylus acutus* (Reptilia: Crocodylidae) en la costa de Jalisco, México. *Anales del Instituto de Biología*. UNAM. Serie Zoología 74(1):35-42.
- Casas, A. G., Iracheta J. F. y H. Caracho.** 1993. Anidación de *Crocodylus moreletii* en cautiverio en Tabasco, México. Memorias de la Primera Reunión de Crocodile Specialist Group de la IUCN. I Taller sobre Zoocria de los Crocodylia, Santa Marta, Colombia.
- Castillo, S. F. A.** 2001. Effects of a submerged net on population size and structure of an American crocodile population (*Crocodylus acutus*) in Lake Amela, Colima, Mexico. *Crocodyle Specialist Group Newsletter*. 20(4):86-92.
- Castillo, S. F. A.** 2005. *Dinámica de la mortalidad de la población de cocodrilo americano Crocodylus acutus en la laguna de Amela, Colima, México y proyección para el incremento del genoma*. Memorias del VII Congreso Latinoamericano de Herpetología. Cuernavaca, Morelos. México.
- Cedeño-Vázquez, J. R.** 2002. *Estado de conservación de Crocodylus acutus y Crocodylus moreletii en el Río Hondo, Bahía de Chetumal y áreas anexas*. Tesis de Maestría. Colegio de la Frontera Sur. Quintana Roo, México.
- Cedeño-Vázquez, J. R., Ross, J. P. y S. Calmé.** 2006. Population status and distribution of *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in southeastern Quintana Roo, México. *Herpetological Natural History*. 10(1):53-66.
- Cifuentes, L. J. y F. G. Cupul.** 2004. *¿Los terribles cocodrilos?* Colección la ciencia para todos (197). Fondo de Cultura Económica. México D.F. México.
- Clark, A. M., Bowen, B. W. y L. C. Branch.** 1999. Effects of natural habitat fragmentation on an endemic scrub lizard (*Sceloporus woodi*): an historical perspective based on a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*. 8:1093-1104.
- Clark, A. M., Moller, P. E., Possardt, E. E., Savitzky, A. H., Brown, W. S. y B. W. Bowen.** 2003. Phylogeography of the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) based on mtDNA sequences. *Journal of Herpetology*, 37(1):145-154.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall.** 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.

- Ciofi, C., Willson, G. A., Beheregaray, L. B., Marquez, C., Gibbs, J.P., Tapia, W., Snel, H. L., Caccone, A. y J. R. Powell.** 2006. Phylogeographic history and gene flow among Giant Galápagos tortoises on southern Isable Island. *Gene Society of America*. 172:1727-1744.
- Cupul, M. F. G.** 2005. Éxito de eclosión del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus* y la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Puerto Vallarta, Jalisco, México. *REDVET*. VI (10):1-7.
- INE/SEMARNAP.** 2000. *Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Crocodylia en México.* (COMACROM).
- Darwin, C.** 1859. *El origen de las especies.* Editores Mexicanos Unidos, S.A. 1ª edición (1999)
- Densemores III, L. D. y P. S. White.** 1991. The systematics and evolution of the Crocodylia as suggested by restriction endonuclease analyses of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA. *Copeia* 3:602-615.
- Dever, J. A. y L. D. Densmore III.** 2001. Microsatellites in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) and their utility in addressing crocodylian population genetics questions. *Journal of herpetology*. 35(3):541-544.
- Dever, J. A., Strauss, R. E., Rainwater, T. R., McMurry S. T. y L. D. Densmore III.** 2002. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia*, 4:1078-1091.
- Dominguez-Laso, J.** 2005. Determinación del estado actual de las poblaciones silvestres del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México y evaluación de su estatus en CITES. *Informe final, Proyecto CS009.* Instituto de Historia Natural y Ecología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Figueroa, B., Cabrera, A. y J. A. Díaz.** 1993. Estudio de crecimiento intensivo en el primer año de vida de *Crocodylus moreletii* bajo condiciones de cautiverio en Tabasco, *Universidad y Ciencia*. UJAT. 10(19):57-64.
- Field, K., Olsen, G., Lane, D., Giovannoni, S., Ghiselin, M., Raff, E., Pace N. y R. Raff.** 1988. Molecular phylogeny of the animal Kingdom. *Science*. 239:748-752.
- Forstner, M. R. J. y J. M. Forstner.** 2001. Aplicaciones del DNA en la conservación de los crocodylios. (Applications of genetics in crocodylian conservation.), pp. 99-117, en: *La Conservación y el Manejo de Caimanes Y Cocodrilos de América Latina Volumen 2.* Luciano

M. Verdade y Alejandro Larriera (eds.) La Región, Fundación Banco Bica, Santo Tomas, Santa Fe, Argentina.

- Frankham, R.** 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*. 10:1500-1508.
- Futuyma, J. D.** 1997. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc. State University of New York. E.U.A.
- García, P. L.** 2004. *Caracterización de los fósiles referidos al género *Crocodylus* en México y un análisis de los patrones biogeográficos del género*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- García-Grajales, J., Aguirre-León, G., Contreras-Hernández, A.** 2007. Tamaño y estructura poblacional de *Crocodylus acutus* (Cuvier 1807) Reptilia: Crocodylidae) en el estero La Ventanilla, Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 23(1)53-71.
- Geneious.** version 1.0 (2006).
- Glenn, T. C., Dessauer H. C. y M. J. Braun.** 1998. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. *Copeia* 3:591-601.
- Glenn, T. C., Staton, J. L., Vu, A. T., Davis, L. M., Alvarado-Bremer, J. R., Rhodes, W. E., Brisbin, L. J. y R. H. Sawyer.** 2002. Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology (Molecular Development and Evolution)*. 294:312-324.
- Google Earth.** 2007. Euro Technologie Image. 2007 TerraMetrics image. 2007 NASA.
- Guzmán, A. M.** 1973. *Biología e importancia económica de los cocodrilos mexicanos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Haenel, G. J.** 1997. Mitochondrial DNA variation in populations of the tree lizard, *Urosaurus ornatus*. *Copeia*. 1:174-178.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*. 41:95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y T. Yano.** 1985. Dating the Human-ape Split by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular and Evolution*. 22:160-174.
- Hedrick, P. W.** 2000. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publisher. Sudbury, Massachusetts.

- Hillis, D., Mortiz, G. y K. Mable.** 1996. *Molecular Systematics*. Sunderland, Massachusetts. EUA.
- Huerta, P.** 1986. Etología, reproducción y biometría del cocodrilo (*Crocodylus moreletii*, Bibron y Duméril), en cautiverio. Tesis de licenciatura. E.N.C.B. IPN. México.
- Hunt, R. H.** 1975. Maternal behavior in the Morlet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *Copeia*. 4:763-764.
- Janke, A., Erpenbeck, D., Nilsson M. y U. Arnason.** 2001. The mitochondrial genomes of iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodylus*) implications for amniote phylogeny. *Proceedings of the Royal Society of London*. B. 268:623-631.
- Krebs, C. J.** 1985. *Ecología, estudio de la distribución y abundancia*. Harla. Instituto de Ecología de Recursos Animales. Universidad de Columbia Británica.
- Klug, M. S. y M. R. Cummings.** 1999. *Conceptos de genética*. Prentice Hall. Madrid.
- Kumazawa, Y. y M. Nishida.** 1995. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Molecular Biology and Evolution*. 12(5):759-772.
- Lacy, R. C.** 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interaction effects of drift, mutation, immigration, selection and population subdivision. *Conservation Biology* 1:143-158.
- Lazcano, M. A.** 1990. Conservación de cocodrilos en Sian Ka'an. *Boletín Amigos de Sian Ka'an*. 6:8-10.
- Li, W-H. y D. Graur.** 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Loa-Loza, E.** 2007. *Concentración de diclorodifeniltricloroetano (DDT) en poblaciones silvestres de cocodrilo (Crocodylus acutus y C. moreletii) en la zona costera de México*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. México.
- León, F.** 1996. La crianza de cocodrilos en México: Cocodrilos Mexicanos. Proceedings 13th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group SSC/IUCN. Santa Fe, Argentina.
- Lunt, D. H., Whipple, L. E. y B. C. Hyman.** 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): Utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*. 7: 1441-1455.

- Magnusson, W. E.** 1985. Habitat selection, parasites and injuries in Amazonia crocodiles. *Amazonia*. 9:193–204.
- Maniatis, F., Fritsch E. F. y J. Sambrook.** 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Magnusson, W. E.** 1987. Diets of Amazonian crocodiles. *Journal of Herpetology*. 21:85-95.
- McAliley, L. R., Ray, E. W., Ray, D. A., White, P. S., Brochu, C. A. y L. D. Densmore III.** 2006. Are Crocodiles Really Monophyletic? – Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolutions*. 39:16-32.
- Merediz, G.** 1999. Los cocodrilos en Quintana Roo. *Boletín de los Amigos de Sian Ka'an*. 16:14-17.
- Meshaka, W. E., Loftus, W. F. y T. Steiner.** 2000. The herpetofauna of Everglades Nacional Park. *Florida Science*. 4-103.
- Muñiz, M. I., Montes, D. y, A. Hernández de Luna.** 1997. Observaciones técnicas sobre cocodrilos en lagunas de Chacahua, Oaxaca. *Crocodile Specialist Group Newsletter*. 16(4):12-13.
- Navarro, S. C.** 2005. El regreso de *Crocodylus moreletii*. *Reptilia, The European Herpetology Magazine*. 49:58-64.
- Nei, M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New Cork: Columbia University Press.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001,** Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. SEMARNAT. México.
- Ouboter, P.E.** 1996. Ecological studies on crocodylians in Suriname: niche segregation and competition in three predators. SPB Academic Publishing, Amsterdam and New York.
- Page, R. D. M. y E. C. Holmes.** 1998. *Molecular Evolution: a Phylogenetic Approach*. Oxford; Malden, MA. Blackwell Science.
- Parkinson, C. L., Zamudio K. R. y H. W. Greene.** 2000. Phylogeography of the pitviper clade *Agkistrodon*: Historical ecology, species status, and conservation of cantils. *Molecular Ecology*. 9:411-420.
- Pereira, S. L.** 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate Phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (4): 745-752.

- Pérez-Higareda, G., Rangel-Rangel, A. y D. Chiszar.** 1995. Growth of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) during the first three years of life. *Zoo Biology*. 14(2):173-177.
- Platt, S. G. y J. B. Throbjarnason.** 2000. Status and conservation of Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*, in Belize. *Biological Conservation* 96:13-20.
- Primack, R., Rozzi, R., Feinsinger, P., Dirzo, R. y F. Massardo.** 2001. *Fundamentos de conservación biológica. Perspectiva latinoamericana*. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.
- Posada, D. y K. A. Crandall.** 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14:817-818.
- Posada, D. y A. Templeton.** 1999-2006. GeoDis 2.5 DOCUMENTATION. Facultad de Biología, Universidad de Vigo. Vigo, España.
- Quijada-Mazarreña, J. A., Ferguson, J. E., Pook, C. E., Da Graca S. M., Thorpe, R. S. y W. Wüster.** 2007. Phylogeographic patterns of trans-amazonian vicariants and amazonian biogeography: the neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus complex*) as an example. *Journal of Biogeography*. (Special Issue) 1-17.
- Ramos, R., de Buffrenil, V. Ross., J. P.** 1994. Current status of the Cuban crocodile, *Crocodylus rhombifer*, in the wild. Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, 113-144. IUCN, Gland, Suiza.
- Ramos, T., R.** 2006. First national works up on the status of the Cuban Crocodile. *Crocodile Specialist Group Newsletter*. 25:(4)5-6.
- Ray, A., D. y L. D. Densmore III.** 2002. The crocodylian mitochondrial control region: general structure, conserved sequences, and evolutionary implications. *Journal of Experimental Zoology (Molecular Development and Evolution)*. 294:334-345.
- Ray, A. D., White, P. S., Duong, H. V., Cullen, T. y L. D. Densmore III.** 2000. High level of genetic variability in west African dwarf crocodiles *Osteolemus tetraspis tetraspis*. 59-63 en Grigg, G. C., Seebacher, F. y C. E. Franklin. *Crocodylian Biology and Evolution*. Surrey Beatty and Sons. Chipping Norton.
- Ray, A. D., Dever, J. A., Platt, S. G., Rainwater, T. R., Finger, A. G., McMurray, S. T., Batzer, M. A., Barr, B., Stafford, P. J., McKnight, J. y L. D. Densmore III.** 2004. Low Levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conservation Genetics* 5:449-462.

- Real Decreto.** 1997/1995, de 7 de diciembre, de medidas para contribuir a garantizar la biodiversidad mediante la conservación de los hábitats naturales y de la flora y fauna silvestres.
- Rodríguez, R. F., y A. G. Casas.** 2005. Morfometría en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*: hipótesis y trascendencia. Memorias del VII Congreso Latinoamericano de Herpetología. Cuernavaca, Morelos. México.
- Ross, C. A.** 1989. *Crocodiles and alligators*. Oxford. New York.
- Ross, J. P.** 1996 Application of the new IUCN criteria to crocodylian status evaluation. Proceedings of the 13th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. 499–504. IUCN, Gland, Suiza.
- Ross, J. P.** (ed.). 1998. Crocodiles. Status survey and conservation action plan. 2^a Edición. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. viii 96 pp.
- Saitou, N. y M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:306-425.
- Sambrook, J. y D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press. New York.
- Seuting, G., Lang, B. F., Mindell, D. P. y R. Morais.** 1994. Evolution of the WANCY region in amniote mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*. 11(3):329-340.
- Schneider, S., Roessli, D. y L. Excofier.** 2000. *Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis*. University of Genova. Suiza.
- Sigler, L.** 1997. Poblaciones silvestres de cocodrilianos en el Estado de Chiapas. Memorias de la 4^a reunión regional del grupo de especialistas en cocodrilos de América Latina y el Caribe. UJAT. Villahermosa, Tabasco. México.
- Sigler, L.** 1998. A *Crocodylus acutus* with appearance of a *C. moreletii*. *Crocodile Specialist Group Newsletter*. 17(3):9-11.
- Templeton, A. R.** 1989. The meaning of species and speciation a genetic perspective. Pp 3-27, en D. Otte, and J. A. Endler (eds.) *Speciation and its consequences*. Sinauer Assoc, Sunderland, MA.
- Thorbjarnarson, J.** 1992. *Crocodiles: an action plan for their conservation*. IUCN, Gland, Suiza.

- Trutnau, L. y R. Summerland.** 2006. *Crococilians, their natural history and captive husbandry*. Edition Chimaira. Frankfurt, Germany.
- Wikipedia.** 2007. Enciclopedia libre (www.wikipedia.com).
- Webb, G. J. W.** 1986. View of a crocodile researcher. *Habitat*. 14(6):34-37.
- Xue-Feng, J., Xiao-Bing W., Yan, L., y A. George.** 2006. Mitochondrial genome of *Crocodylus niloticus* with Implications for phylogenetic relationships among crocodilian species. *Acta Zoologica Sinica*. 52(4):818-818.
- Yang, Z.** 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Tree*. 11(9)367-372.
- Zaldivar-Riverón, A., Nieto-Montes de Oca, A. y J. P. Lacleste.** 2005. Phylogeny and evolution of dorsal patterns in the Mexican endemic lizard genus *Barisia* (Anguidae: Gerhonotinae). Blackwell Verlag, Berlin, *Journal of Zoology Systematics and Evolution Reserch*. 43(3)243-257.

APÉNDICE A

Alineamiento de haplotipos únicos de la región control de la mitocondria correspondientes a

Crocodylus acutus (ACU01-02) y *C. moreletii* (MOR01-03) en México.

	1	10	20	30	40	50	60
ACU01	GTCCCGAAT	GACAAAC GG A	CTA A CCAAAA	ACTACGAGCA	CTATTACCTT	TCC CC AGACAA	
ACU02	GTCCCGAAT	GACAAAC GG A	CTA A CCAAAA	ACTACGAGCA	CTATTACCTT	TCC CC AGACAA	
MOR03	GTCCCGAAT	GACAAAC AA A	CCA A CCAAAA	ACCACGAGCA	CTATTACCTT	CC CC AA-ACAA	
MOR02	GTCCCGAAT	GACAAAC AA A	CCA A CCAAAA	ACCACGAGCA	CTATTACCTT	CC CC AA-ACAA	
MOR01	GTCCCGAAT	GACAAAC AA A	CCA A CCAAAA	ACCACGAGCA	CTATTACCTT	CC CC AA-ACAA	
	61	70	80	90	100	110	120
ACU01	AAAGATAAT	ATGTAC C ACC	CCCC-AGCTA	TGTATTATA A	GGCATT C ATT	TAT T TGCCCCT	
ACU02	AAAGATAAT	ATGTAC C ACC	CCCC-AGCTA	TGTATTATA A	GGCATT C ATT	TAT T TGCCCCT	
MOR03	AAAGATAAT	ATGTAC T ACC	CCCC C AGCTA	TGTATTATA A	GGCATT C AT C	TAT C TGCCCCT	
MOR02	AAAGATAAT	ATGTAC T ACC	CCCC C AGCTA	TGTATTATA A	GGCATT C AT C	TAT C TGCCCCT	
MOR01	AAAGATAAT	ATGTAC T ACC	CCCC C AGCTA	TGTATTATA A	GGCATT C AT C	TAT C TGCCCCT	
	121	130	140	150	160	170	180
ACU01	AACACCCAT	CCAT T AGTTC	TTATTAATCA	GCATCTCACG	TGAAATCACC	ATCCATTGTAT	
ACU02	AACACCCAT	CCAT T AGTTC	TTATTAATCA	GCATCTCACG	TGAAATCACC	ATCCATTGTAT	
MOR03	AACACCCAT	CCAT C AGTTC	TTATTAATCA	GCATCTCACG	TGAAATCACC	ATCCATTGTAT	
MOR02	AACACCCAT	CCAT C AGTTC	TTATTAATCA	GCATCTCACG	TGAAATCACC	ATCCATTGTAT	
MOR01	AACACCCAT	CCAT C AGTTC	TTATTAATCA	GCATCTCACG	TGAAATCACC	ATCCATTGTAT	
	181	190	200	210	220	230	240
ACU01	CCATACTAA	CTAT T ACTAG	TCTCAAGCCC	ATACCTGGAC	ACG A CTCACA	TTCATTGCTCT	
ACU02	CCATACTAA	CTAT T ACTAG	TCTCAAGCCC	ATACCTGGAC	ACG A CTCACA	TTCATTGCTCT	
MOR03	CCATACTAA	CTAT C ACTAG	TCTCAAGCCC	ATACCTGGAC	ACG G CTCACA	TTCATTGCTCT	
MOR02	CCATACTAA	CTAT C ACTAG	TCTCAAGCCC	ATACCTGGAC	ACG G CTCACA	TTCATTGCTCT	
MOR01	CCATACTAA	CTAT C ACTAG	TCTCAAGCCC	ATACCTGGAC	ACG G CTCACA	TTCATTGCTCT	
	241	250	260	270	280	290	300
ACU01	TCTTAGAGA	CCTCTGGTTA	TCACTCTCAC	GTACC C ATCT	TGCTATTGCC	TGGACATTCTT	
ACU02	TCTTAGAGA	CCTCTGGTTA	TCACTCTCAC	GTACC C ATCT	TGCTATTGCC	TGGACATTCTT	
MOR03	TCTTAGAGA	CCTCTGGTTA	TCACTCTCAC	GTACC T ATCT	TGCTATTGCC	TGGACATTCTT	
MOR02	TCTTAGAGA	CCTCTGGTTA	TCACTCTCAC	GTACC C ATCT	TGCTATTGCC	TGGACATTCTT	
MOR01	TCTTAGAGA	CCTCTGGTTA	TCACTCTCAC	GTACC T ATCT	TGCTATTGCC	TGGACATTCTT	
	301	310	320	330	340	350	360
ACU01	TCCTCTTCT	TAGAGGCCTC	AACCCGCACC	ATATGGTTTC	ACTCATT C AC	GTCCGTGATCG	
ACU02	TCCTCTTCT	TAGAGGCCTC	AACCCGCACC	ATATGGTTTC	ACTCATT C AC	GTCCGTGATCG	
MOR03	TCCTCTTCT	TAGAGGCCTC	AACCCGCACC	ATATGGTTTC	ACTCATT C AC	GTCCGTGATCG	
MOR02	TCCTCTTCT	TAGAGGCCTC	AACCCGCACC	ATATGGTTTC	ACTCATT C AC	GTCCGTGATCG	
MOR01	TCCTCTTCT	TAGAGGCCTC	AACCCGCACC	ATATGGTTTC	ACTCATT C AC	GTCCGTGATCG	
	361	370	380	390	400	410	420
ACU01	CGGCAT C CC	C TTTTTTCAA	TTGCTATTGG	TTCTTTATTT	TTTTGGGGAG	ATCTCATCCAC	
ACU02	CGGCAT C CC	T TTTTTTCAA	TTGCTATTGG	TTCTTTATTT	TTTTGGGGAG	ATCTCATCCAC	
MOR03	CGGCAT T C	C TTTTTTCAA	TTGCTATTGG	TTCTTTATTT	TTTTGGGGAG	ATCTCATCCAC	
MOR02	CGGCAT T C	C TTTTTTCAA	TTGCTATTGG	TTCTTTATTT	TTTTGGGGAG	ATCTCATCCAC	

MOR01	CGGCATCTC	CTTTTTTCAA	TTGCTATTGG	TTCTTTATTT	TTTTGGGGAG	ATCTCATCCAC
	421	430	440	450	460	470 480
ACU01	TACCCGGGG	GCTTATATCT	AAAATCATTAA	AATTAAGGTA	GTGCATTTTC	CTTGCAGAACG
ACU02	TACCCGGGG	GCTTATATCT	AAAATCATTAA	AATTAAGGTA	GTGCATTTTC	CTTGCAGAACG
MOR03	TACCCGGGG	GCTTATACCT	AAGATCATTAA	AATCAAGGTG	GTGCATTTTC	CTTGCAGGTCG
MOR02	TACCCGGGG	GCTTATACCT	AAGATCATTAA	AATCAAGGTG	GTGCATTTTC	CTTGCAGGACG
MOR01	TACCCGGGG	GCTTATACCT	AAGATCATTAA	AATCAAGGTG	GTGCATTTTC	CTTGCAGGACG
	481	490	500	510	520	530 540
ACU01	GACCAGTCC	GACTTTTCAT	GTACATAAATA	TTTAATGCTC	GTTATACATA	TTACCCTTTAA
ACU02	GACCAGTCC	GACTTTTCAT	GTACATAAATA	TTTAATGCTC	GTTATACATA	TTACCCTTTAA
MOR03	GACCAGTTC	GGCTTTTCAT	GTACATAAATA	TTTAATGCTC	GTTATACATA	TTACTCTTTAA
MOR02	GACCAGTCC	GGCTTTTCAT	GTACATAAATA	TTTAATGCTC	GTTATACATA	TTACTCTTTAA
MOR01	GACCAGTTC	GGCTTTTCAT	GTACATAAATA	TTTAATGCTC	GTTATACATA	TTACTCTTTAA
	541					
ACU01	TTAGGCCCC					
ACU02	TTAGGCCCC					
MOR03	TTAGGCCCC					
MOR02	TTAGGCCCC					
MOR01	TTAGGCCCC					

APÉNDICE B.

Traducción de clave de inferencias al obtener resultados de GeoDis para el NCPA 11nov2005.
Traducida por Martín Sánchez Vilchis con la colaboración de Abraham Vilchis Chávez.

D_c Distancia de clados - extensión geográfica del clado.

D_n Distancia del clado anidado – la manera en que está distribuido un clado relativamente con respecto a otros clados en el mismo nivel-superior dentro de la categoría de anidamiento.

IT (Interior-Tip)

Clave GeoDis

1. ¿Todos los clados se encuentran dentro del clado de anidamiento en áreas separadas sin traslape?
 - No – ir al paso 2.
 - Sí – ir al paso 19.

2. ¿Se cumple al menos una de las siguientes condiciones?
 - a) Las D_c para una o más puntas son significativamente menores y las D_c para una o más de las interiores son significativamente mayores o no significativas.
 - b) Las D_c para una o más puntas son significativamente menores o no significativas y las D_c para algunos pero no todos los interiores son significativamente menores.
 - c) Las D_c para uno o más interiores son significativamente mayores y las D_c para las puntas son significativamente menores o no significativas.
 - d) La I-T D_c es significativamente mayor
 - No – ir al paso 11.
 - Sí – ir al paso 3.
 - El estatus de la punta/interior no puede determinarse – **Resultado no concluyente.**

3. ¿Se cumple al menos una de las siguientes condiciones?
 - a) Algunos valores D_n y/o I-T D_n son significativamente inversos a los valores D_c .
 - b) Uno o más clados punta muestran D_n significativamente mayores.
 - c) Uno o más clados interiores muestran D_n significativamente menores.

- d) La I-T D_c tiene una D_n significativamente menor con el valor D_c no significativo correspondiente.
- No – ir al paso 4.
 - Sí – ir al paso 5.
4. ¿Se cumplen las siguientes dos condiciones?
- a) Los clados (ó 2 ó más subconjuntos de éstos) con valores D_c o D_n significativamente menores tienen áreas que son completamente o mayoritariamente no traslapadas con los otros clados en el grupo anidado (particularmente interiores).
- b) En la condición anterior, el patrón de todas o la mayoría de las áreas no traslapadas representan un rompimiento o reversión del nivel anterior en la cadena dentro de la serie de clados anidados (sólo aplica para clados de niveles altos).
- No – **Flujo génico restringido con aislamiento por distancia** (dispersión restringida por distancia en especies no sexuales). Esta inferencia se fortalece si los clados con distribuciones restringidas se encuentran en diversos lugares, si la unión de sus áreas corresponde aproximadamente al área de uno o más clados (usualmente interiores) dentro del mismo grupo anidado (aplicable sólo a clados anidados con varios miembros en el clado o a los clados de los niveles más altos a pesar del numero), y si los valores D_c incrementan y geográficamente se extienden más con un nivel de clado creciente dentro de una serie de anidamientos (aplicable sólo a clados de niveles superiores).
 - Sí – ir al paso 9.
5. ¿Se cumplen las siguientes dos condiciones?
- a) Los clados (ó 2 ó más subconjuntos de éstos) con valores D_c significativamente menores tienen áreas de distribución que están en su mayoría o completamente superpuestas con los otros clados en el grupo anidado (particularmente interiores).
- b) Los patrones de todas o la mayoría de las áreas que no se superponen en la condición anterior representan un rompimiento o reversión del nivel anterior dentro de la series de clados anidados (aplicable sólo para clados de niveles superiores).
- No – ir al paso 6.
 - Sí – ir al paso 15.

6. ¿Los clados (o haplotipos dentro de éstos) con reversiones o valores D_n significativos sin valores D_c significativos delimitan dos o más subconjuntos que concuerdan geográficamente?
 - No – ir al paso 7.
 - Sí – ir al paso 13.
 - **MUY POCOS CLADOS (≤ 2) PARA DETERMINAR CONCORDANCIA – Resolución genética insuficiente para distinguir entre el Área de Expansión/Colonización y la Dispersión restringida/Flujo génico-** Prosiga al paso 7 si el muestreo geográfico es suficiente para distinguir entre movimientos de distancia cortos versus largos.
7. ¿Los clados con D_n significativamente mayores (o en general, clados punta cuando D_n para I-T es significativamente menor) están separados de los otros clados por áreas geográficas intermedias que fueron muestreadas?
 - No – ir al paso 8.
 - Sí – **Flujo génico restringido/dispersión con algún dispersor de larga distancia.**
8. ¿La especie está ausente en el área no muestreada?
 - No - **Diseño de muestreo inadecuado para distinguir entre Asilamiento por Distancia (movimientos de distancias cortas) contra Dispersión de larga distancia.**
 - Sí - **Flujo génico restringido/Dispersión pero con alguna dispersión de larga distancia sobre áreas intermedias no ocupadas por la especie; o flujo génico pasado por extinción de poblaciones intermedias.**
9. ¿Las diferentes áreas geográficas clado identificadas en el paso 4 están separadas por áreas que aún no han sido muestreadas?
 - No - **Fragmentación alopátrida.** (Si se deduce desde un clado de nivel superior, se contará con confirmación adicional si los clados que muestran restricción por al menos distribuciones no traslapadas parcialmente están conectadas mutacionalmente una a la otra por un número de pasos superior al promedio).
 - Sí – ir al paso 10.
10. ¿La especie está ausente en las áreas no muestreadas?

- No - **Estrategia de muestreo geográfico inadecuada para distinguir entre fragmentación y aislamiento por distancia.**
- Sí - **Fragmentación alopátrida** (Si se deduce desde un clado de nivel superior, se contará con confirmación adicional si los clados que muestran restricción por al menos algunas distribuciones no traslapadas parcialmente están conectadas mutacionalmente una a la otra por un número de pasos superior al promedio).

11. ¿Se cumple al menos una de las siguientes condiciones?

- a) El valor(es) D_c para algún(os) clado(s) punta es/son significativamente mayor.
- b) El valor(es) D_c para todos los interiore(s) es/son significativamente menor.
- c) La I-T D_c es significativamente pequeña.

- No – ir al paso 17.
- Sí – **Expansión del área de distribución**, ir al paso 12.

12. ¿Los valores D_n y/o IT D_n son significativamente inversos a los valores para D_c ?

- No – **Expansión del área de distribución contigua.**
- Sí – ir al paso 13.

13. Los clados con D_n significativamente mayores (o en general clados punta cuando D_n para I-T es significativamente menor) están separados del centro geográfico de los otros clados por áreas geográficas intermedias que fueron muestreadas?

- No – ir a paso 14.
- Sí - **Colonización de larga distancia posiblemente conectada con fragmentación subsecuente** (hay indicios de fragmentación subsecuente si los clados que muestran distribuciones restringidas por al menos áreas de distribución no traslapadas están mutuamente conectadas una a la otra por un número de pasos mayor al promedio) **o Fragmentación seguida de una expansión del área de distribución.** Para ver si contacto secundario está implicado, efectuar las pruebas suplementarias dadas en: Templeton, *Molecular Ecology*, **10**:779-791,2001. Para distinguir el tipo de movimiento que obedece a este patrón, ir al paso 21.

14. ¿La especie está presente en las áreas geográficas intermedias que no fueron muestreadas?

- **Sí – Diseño de muestreo inadecuado para distinguir entre Expansión del área de distribución contigua, Colonización de larga distancia, y Fragmentación en el pasado.**
- **No- Colonización de larga distancia y/o Fragmentación en el pasado** (no necesariamente mutuamente exclusiva). Si se deduce desde un clado de nivel superior, se deduce fragmentación en vez de colonización si los clados que muestran distribución restringida pero al menos distribuciones parcialmente no traslapadas y conectadas mutuamente una a la otra por un número de pasos mayor que el promedio. Si las longitudes de las ramas son cortas, se deduce un evento de colonización, tal vez asociado con una fragmentación reciente. Para distinguir el tipo de movimiento que rige este patrón, ir al paso 21.

15. ¿Las diferentes áreas de los clados identificadas en el paso 5 están separadas por áreas que no están muestreadas?

- **No – Fragmentación en el pasado y/o colonización a larga distancia** (no necesariamente mutuamente exclusiva). Si se deduce desde un clado de nivel superior, se deduce fragmentación en vez de colonización si los clados que muestran distribución restringida pero al menos las distribuciones parcialmente no traslapadas y conectadas mutuamente una a la otra por un número de pasos mayor que el promedio. Si son cortas las longitudes de las ramas, se deduce un evento de colonización, tal vez asociado con una fragmentación reciente. Para distinguir el tipo de movimiento que rige este patrón, ir al paso 21.
- **Sí – ir al paso 16**

16. ¿La especie está presente en las áreas geográficas intermedias que no fueron muestreadas?

- **Sí – ir al paso 18.**
- **No – Fragmentación alopátrida.** Si se deduce desde un clado de nivel superior, confirmación adicional tiene lugar si: los clados que muestran distribuciones restringidas por al menos áreas de distribución no traslapadas están mutuamente conectadas una a la otra por un número de pasos mayor al promedio.

17. ¿Alguna de las siguientes condiciones se cumplen?

- a) Los valores Dn para la punta o algunos (pero no todos) de los clados interiores son significativamente menores.
- b) La(s) Dn para uno o más clados interiores es/son significativamente mayor(es).
- c) El valor de I-T Dn es significativamente mayor.
- No – **Resultado no concluyente.**
- Sí – Ir al paso 4.

18. ¿Los clados se encuentran en las diferentes zonas geográficas separadas por una distancia de rama superior con un número mayor de pasos mutacionales que el promedio?

- No – **Muestreo geográfico mal planeado para distinguir entre Fragmentación, Expansión del área de distribución y Aislamiento por distancia.**
- Sí – **Muestreo geográfico mal planeado para distinguir entre Fragmentación y Aislamiento por distancia.**

19. ¿La especie está presente en las áreas entre los clados separados?

- No – **Fragmentación alopátrida.** Si se deduce desde un clado de nivel superior, confirmación adicional tiene lugar si: los clados que muestran distribuciones restringidas por al menos áreas de distribución no traslapadas están mutuamente conectadas una a la otra por un número de pasos mayor al promedio.
- Sí – ir al paso 20.

20. ¿La especie fue muestreada en áreas entre los clados separados?

- No – **Muestreo geográfico inadecuado.**
- Sí – Ir al paso 2.

21. ¿Es verdad todo lo siguiente?

- a) ¿Biológicamente, es factible que el organismo pudiera haber experimentado un movimiento de larga distancia?
- b) ¿Los halotipos anidados que señalan una colonización potencial de larga distancia se encuentran dentro de un clado que muestra evidencia de un crecimiento poblacional por medio de otros métodos (tales como distribuciones desajustadas)?

c) A nivel de todo el clanograma, ¿el cladograma no inferido para haber producido colonización de larga distancia no presenta evidencia de crecimiento poblacional en el pasado con otros métodos?

Sí – Movimiento de colonización de larga distancia.

No – Evidencia insuficiente para distinguir entre movimientos de larga distancia del organismo y los efectos combinados de movimiento gradual durante un proceso de expansión del área de distribución y fragmentación. Si el caso contra el movimiento de larga distancia es convincente, entonces la deducción es **Expansión gradual del área de distribución en el pasado por fragmentación.**