

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL

**“VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL EN EL
COCODRILO DE RÍO (*Crocodylus acutus*, CUVIER
1807) DE LA COSTA DE OAXACA, MÉXICO”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ SAMUEL SAID SERRANO GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL : DR. CARLOS G. VÁZQUEZ PELÁEZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. RAÚL ULLOA ARVÍZU

DRA. IRENE DE LOS ÁNGELES BARRIGA SOSA

MÉXICO D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fue realizado gracias a la Beca para estudios de Maestría otorgada por el CONACYT, Número de registro: CVU Becario 219939/2073368.

La presente investigación se realizó en:

El laboratorio de Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa bajo la asesoría de la Dra. Irene D. L. A. Barriga Sosa.

DEDICATORIAS

Una vez más a mi hermano LAI José Dagoberto Rentarías Gómez y mi madre María Teresa Gómez Martínez.

A todos aquellos colegas, Médicos Veterinarios Zootecnistas que con su esfuerzo incansable trabajan por la conservación biológica y velan por la salud animal y humana en nuestro país, para el engrandecimiento del mismo. Estimados colegas y amigos: Por la dignificación y reconocimiento de nuestra querida profesión, jamás nos detengamos en el camino de nuestra superación ya que ello redundará en el beneficio colectivo, y no olvidemos nunca el compromiso que la Medicina Veterinaria tiene con la sociedad mexicana.

AGRADECIMIENTOS

A mi Querida Universidad Nacional Autónoma de México. Es un gran orgullo haberme formado en su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

De manera muy especial quiero agradecerle a la Maestra en Ciencias Claudia Garnica Rivera por haberme enseñado lo necesario para poder realizar el trabajo del laboratorio.

MUCHAS GRACIAS. A ti te debo en gran parte el poder haber realizado éste trabajo.

Asimismo a mi amigo Dr en B. Luís Manuel Guevara Chumacera por su gran e invaluable ayuda por sus explicaciones concretas, concisas, claras y sobre todo bien razonadas para los análisis.

MUCHAS GRACIAS. Ojalá muchos profesores que ya están dentro de las diferentes universidades tuvieran tus cualidades.

Al Dr. Carlos Vázquez Peláez por su apoyo y ayuda en todo momento que lo necesité. MUCHAS GRACIAS.

A mi comité tutorial:

Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa y Dr. Raúl Ullóa Arvízu.

Y de forma mucho muy especial a la Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa. Gracias por todo tu apoyo, ayuda y por la paciencia para tolerar a una persona tan difícil. MUCHAS GRACIAS.

A mis amigos de CPA:

M en C Belem de Jesús Huerta Lozano

M en C Sofia González Guzmán

M en C N. Rebeca Martínez

En especial:

M en C Rodrigo Jesús Barrón Rodríguez (GRACIAS POR ESTOS YA CASI 12 AÑOS DE AMISTAD)

A los amigos de la Planta Experimental de Producción Acuícola:

M en C Rosa María García Martínez

Hidrobiól. Alejandro Flores Valle.

Al buen amigo Biól. Marco Antonio López Luna y sus estudiantes, por su valiosa ayuda para la toma de muestras en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco UJAT.

A la M en C Alejandro Buenrostro y al M en C Jesús García Grajales de la UMAR Oaxaca por su invaluable ayuda en el muestreo de los esteros La Vainilla y la Ventanilla.

A la MVZ Verónica Peña Crisantos del CIVS “David Móntes Cuevas” por su colaboración en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua Oaxaca. Asimismo a los voluntarios del mismo centro.

A Dirección General de Vida Silvestre de SEMARNAT, en especial al Dr. Fernando Cortés Villavicencio. Y de forma muy especial a mi querido amigo MVZ Heber Ramón Santiago López. Lo mínimo que puedes hacer por aquellos que han traído a tu vida alegría, ánimo, esperanza, inspiración, fortaleza en los momentos difíciles es decirles MUCHAS GRACIAS POR TODO: Troy Stetina, Iron Maiden, Cannibal Corpse, Black Sabbath, Judas Priest, Gamma Ray, Helloween, Kreator, Deicide, Carcass, Slayer, Epica.

A mis hermanos: José Dagoberto Rentarías Gómez, José Manuel Rentarías Gómez, Jaime Rentarías Gómez y Alma Delia Serrano Gómez. Y claro a todos mis sobrinos: Chris, Xochitl, Omar, Manuel, Ivana, Mariana, Enrique y Metzin.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA	
El cocodrilo de río (<i>Crocodylus acutus</i> , Cuvier 1807)	4
El cocodrilo de pantano (<i>Crocodylus moreletii</i> , Morelet 1850)	5
El ADN mitocondrial	6
La región control del ADN mitocondrial (D-Loop) de vertebrado	8
Estimadores de la Diversidad Genética a nivel de ADN	10
Redes haplotípicas	11
Método de Parsimonia estadística	11
Relaciones filogenéticas (Cladogramas)	12
Estudios de Genética poblacional en el Orden Crocodylia	13
Implicaciones en Conservación	15
JUSTIFICACIÓN	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Traajo de campo	18
Modalidades de captura de cocodrilos	20
Toma de muestras sanguíneas	20
Trabajo de laboratorio	21
Identificación de muestras	21
Extracción y visualización de ADN genómico total (ADNt)	21
Amplificación de la región de interés vía PCR	
mediante el empleo de la <i>Taq</i> polimerasa	22
Purificación de los fragmentos amplificados	23
Secuenciación de productos amplificados de la región control mitocondrial	24
Trabajo de Gabinete	25
Relaciones filogenéticas e identidad de las secuencias estudiadas	25
Relaciones haplotípicas de las poblaciones de estudio	26
Diversidad genética	26
RESULTADOS	26
Análisis de secuencias	26
Patrones de secuencias	29

Diversidad genética	26
Relaciones filogenéticas e identidad de las secuencias estudiadas	28
Análisis filogenéticos	28
Red de Haplotipos únicos	33
Relaciones haplotípicas de las poblaciones de estudio	34
Distribución de haplotipos de <i>C. acutus</i>	34
Distribución de haplotipos de secuencias que presentaron identidad con	
<i>C. moreletii</i>	35
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	36
Posibilidad de hibridación entre <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i>	40
LITERATURA CITADA	46
LISTA DE FIGURAS	54
LISTA DE CUADROS	55

Planteamiento del problema

El estudio de los crocodilianos, a escala mundial, abarca un amplio número de áreas del conocimiento, como lo son: taxonomía, paleontología, ecología, biología (por ejemplo determinación de sexo por temperatura), filogenia y sistemática, evolución, zoogeografía, citogenética, genética de poblaciones, etología, bioquímica, fisiología. Además de ser utilizados como modelo biológico en investigación biomédica. Todas estas áreas de investigación tienen entre otros objetivos la conservación incluyendo el aprovechamiento y uso sustentable de las especies y su hábitat, procurando el mantenimiento de los cocodrilos como recurso natural renovable (SEMARNAP 1997).

En México existen pocos trabajos publicados sobre genética poblacional de las diferentes especies de cocodrilos que se encuentran en territorio nacional, por lo que se hace necesario el desarrollo de investigaciones tendientes a conocer el estatus genético de las poblaciones de este grupo de reptiles. El conocimiento generado a través de dichos trabajos permitirá establecer estrategias de manejo y conservación congruentes con la situación particular observada, para de ésta forma conservar el recurso viable para su aprovechamiento en el largo plazo.

El presente trabajo se realizó en el Estado de Oaxaca, en donde no se han llevado a cabo estudios de genética molecular que permitan conocer el estatus genético de la especie de estudio (*Crocodylus acutus*).

**Variabilidad genética de la región control del ADN mitocondrial en el Cocodrilo de Río
(*Crocodylus acutus* Cuvier1807) de la Costa de Oaxaca, México.**

INTRODUCCIÓN

Las aves y cocodrilos son los únicos descendientes vivos de un antiguo grupo de animales conocido como Arcosaurios (Zug 2001). Los cocodrilos modernos aparecieron hace aproximadamente 80 millones de años y radiaron en 125 géneros, de los cuáles sólo ocho permanecen en la actualidad, agrupándose en cuatro Familias, Alligatoridae, Crocodylidae, Gavialidae y Tomistomidae, que conforman el orden Crocodylia (Pough 2003). Existen 28 especies y subespecies pertenecientes a dicho orden, todas ellas distribuidas entre las regiones tropicales del planeta (Mader 2006).

En México encontramos tres especies de crocodilianos: el cocodrilo de pantano, *Crocodylus moreletii*, el cocodrilo de río, *Crocodylus acutus*, y el caimán *Caiman crocodylus fuscus*. Estos reptiles desempeñan un papel de importancia en el equilibrio de los humedales. Como depredadores, se encuentran en la cima de la pirámide alimenticia, interviniendo en el control de las poblaciones de otros animales, incorporan materia orgánica al medio acuático a través de las heces producidas por la digestión de su alimento, asimismo participan en el reciclaje de nutrientes al consumir cadáveres; además de mantener canales abiertos que comunican a los cuerpos de agua entre sí (García, *et al.* 2007). En las zonas pantanosas construyen fosas circulares que constituyen el único refugio de la fauna acuática durante la época de sequía (Álvarez-del Toro 1974). Debido a esto, los cocodrilos son considerados especies clave, dado que desempeñan importantes funciones en el mantenimiento de los ecosistemas y por ende de la biodiversidad presente en ellos (Ross y Janke 2008).

La Taxonomía y Filogenia de éste grupo de reptiles ha sido bien estudiada. Sin embargo, con la excepción del aligador americano, *Alligator mississippiensis*, se han realizado pocos trabajos sobre genética poblacional de cocodrilos. En la actualidad, tal situación está siendo subsanada con algunas investigaciones sobre diferentes miembros del género *Crocodylus* (*C. acutus*, *C. rhombifer*, *C. johnstoni*, *C. moreletii* y *C. porosus*). Asimismo se han iniciado diversos estudios con especies de caimanes (Ray *et al.* 2000). Las dos especies de cocodrilos mexicanos se encuentran incluidas en la lista roja de especies amenazadas de la IUCN por sus siglas en Inglés, Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales y en el Apéndice I de CITES (Convención

Internacional para el Tráfico de Especies Silvestres de Flora y Fauna), por lo que su comercio internacional está prohibido. Mientras que el caimán se encuentra en el Apéndice II (IUCN 2001 y CITES 2008). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, menciona a las tres especies como sujetas a Protección Especial (SEMARNAT 2001).

Cabe mencionar que existe ya una propuesta para transferir del Apéndice I al II de CITES al *C. moreletii* de México, y de ésta manera poder aprovechar de manera racional a la especie. Tal medida se fundamenta en estudios poblacionales en vida silvestre y al censo realizado en los diferentes criaderos de éste reptil. Demostrándose que la especie ya no se vería amenazada en el caso de que se iniciara la explotación comercial de la misma (CITES 2008).

Recientemente la IUCN y el Grupo de Especialistas en Cocodrilos, han hecho énfasis en la necesidad de realizar investigaciones orientadas a conocer la situación genética de poblaciones de diferentes especies de cocodrilos, incluyendo aquellas que se encuentran seriamente amenazadas. Los objetivos de estos trabajos estarían encaminados a obtener información básica sobre diversidad genética, filogeografía, estructura poblacional, patrones de migración, así como reunir datos sobre paternidad, almacenamiento de esperma e introgresión, entre otros. Se hace necesario conocer el estatus genético de las especies de cocodrilos para así poder establecer las medidas de conservación necesarias para las diferentes poblaciones (Ray *et al.* 2004).

HIPÓTESIS

Si ha existido un intercambio genético entre diferentes especies del género *Crocodylus*, como consecuencia de actividades antropogénicas, entonces existe hibridación, la cual puede ser evidenciada mediante análisis de la región control del mtDNA.

HIPÓTESIS

Si ha existido un intercambio genético entre diferentes especies del género *Crocodylus*, como consecuencia de actividades antropogénicas, entonces existe hibridación, la cual puede ser evidenciada mediante análisis de la región control del mtDNA.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo consisten en:

Objetivo general:

- Determinar la variabilidad de la región control del mtDNA en el Cocodrilo de Río *Crocodylus acutus* en los esteros muestreados en el Estado mexicano de Oaxaca.

Objetivos específicos

- Establecer si la identidad de los individuos muestreados corresponde a la especie *Crocodylus acutus* o a otra especie del mismo género.
- Inferir relaciones filogenéticas entre miembros del género *Crocodylus*
- Evidenciar la posibilidad de hibridación entre *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii*, mediante el análisis de relaciones intraespecíficas de la región control.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

El cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*, Cuvier 1807).

En México *C. acutus* es conocido de diferentes formas dependiendo de la región o estado de que se trate, por ejemplo: caimán, lagarto real, lagarto amarillo, lagarto fino, cocodrilo de río, cocodrilo picudo. En Centroamérica se le conoce con varios nombres, entre los más comunes se puede mencionar: lagarto y caimán, este último se utiliza en Cuba y en Colombia. En Sudamérica se le conoce como caimán picudo y en los Estados Unidos como american crocodile (SEMARNAP 1997).

Crocodylus acutus presenta la extensión rostral más alargada de todos los cocodrilos de las regiones costeras del geotrópico del hemisferio Norte. Presenta un hocico notablemente alargado, su longitud es de 1.75 a 2.5 veces mayor que el ancho basal. Poseen de dos a cuatro escamas post-occipitales en una hilera transversal, cuatro escamas nucales al menos, en dos pares yuxtapuestos y frecuentemente con un escudo en cada lado, alineado con la hilera anterior o entre las hileras anteriores o posteriores; escamas nucales y dorsales ampliamente separadas; las escamas poseen osteodermos arreglados en 16 ó 17 hileras transversales y cuatro o cinco longitudinales con quillas poco definidas, en los costados las escamas de la hilera transversal son regularmente alineadas y usualmente poco aquilladas. No hay pliegue gular o poco desarrollado. Figura 1. (SEMARNAP 1997).

En la vertiente del Atlántico se distribuye desde Florida y Louisiana en los Estados Unidos, hasta el noroeste de Venezuela y las Islas de Cuba, Jamaica, Santo Domingo y Haití y por el Pacífico desde México hasta Perú. En éste mismo océano en las costas mexicanas se encuentra en Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, y en el Atlántico en los Estados de Quintana Roo y Yucatán (SEMARNAP 1997).

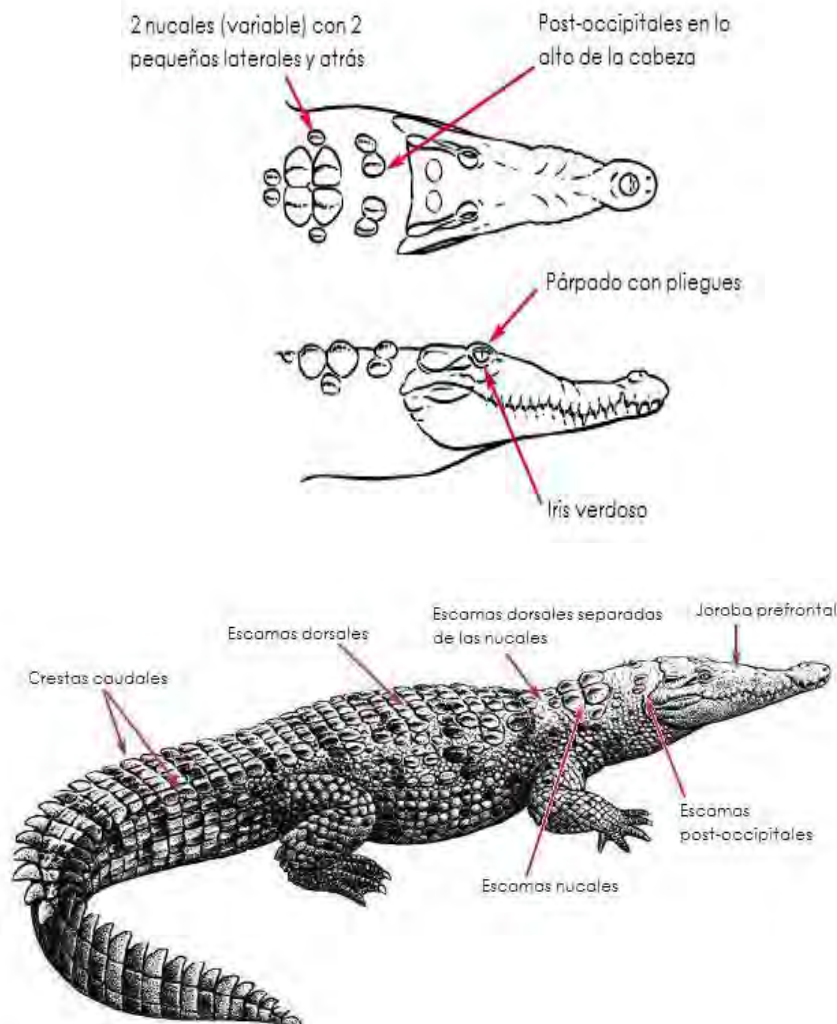


Figura 1.- Morfología del cocodrilo de río *Crocodylus acutus* (Modificado de CITES 1995).

El cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*, Morelet 1850)

Se distingue por ser de tamaño promedio entre 3 a 3.5 m. La cabeza es aplanada y ancha, hocico relativamente corto y bastante redondeado en la punta. Su longitud es 1.5 a 1.7 veces el ancho basal. En el cuello tiene cuatro o más escudos postoccipitales y seis o más nucales. Las escamas del tronco están separadas de las nucales; las primeras poseen osteodermos más o menos regulares, arreglados en 16 o 17 hileras transversales y de 4 a 6 longitudinales; las hileras laterales de las extremidades son lisas y aplanadas; poseen un fleco escamoso distintivo sobre los márgenes de ambos pares de extremidades. Las escamas ventrales tienen glándulas foliculares y sin botones osteodermicos. Figura 2. (SEMARNAT, 2000).

Se distingue *C. acutus* por que presenta en la cola verticilios intercalados en la parte ventral.

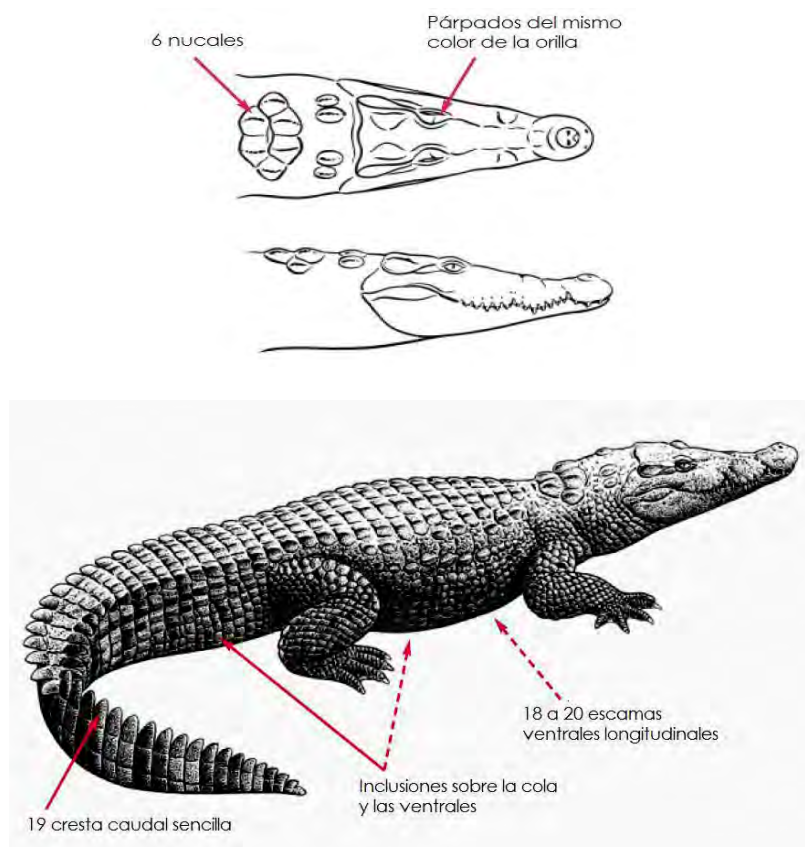


Figura 2.- Morfología del cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii* (Modificado de CITES, 1995).

El cocodrilo de pantano se encuentra distribuido en la Costa del Golfo de México, desde el centro y posiblemente norte de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán; Belice y norte de Guatemala. En México ha sido reportado en los Estados de Campeche, Chiapas, Quintana Roo, San Luís Potosí,

Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Se le encuentra en arroyos, ciénegas, lagunas que están dentro de bosques y selvas, en ríos de corriente lenta. No existen reportes de su presencia en aguas salobres.¹ (SEMARNAP 1997).

1. Nota. En la fuente citada se presenta el año de publicación. En el presente trabajo se encontró que tal situación no es del todo cierta, dado que se encontraron ejemplares de la especie en zonas costeras.

El ADN mitocondrial (mtDNA)

El ADN mitocondrial (mtDNA) es una porción del genoma eucarionte muy útil para investigar aspectos relacionados con la filogenia, historia evolutiva, filogeografía y genética de poblaciones. Al ser una molécula pequeña y compacta que no presenta recombinación, con tasas de sustitución 10 veces más altas que la de los genes nucleares, permite revelar diferencias entre poblaciones (Glenn *et al.* 2002). Es una molécula heredada por el lado materno en muchas especies. Es por esto que la progenie hereda una copia del mtDNA de su madre. Existen miles de copias en un huevo y relativamente pocas en los espermatozoides. Las cuales son activamente destruidas durante el proceso de la fecundación (Sutherland *et al.* 1998, Griffiths, *et al.* 1996).

Existen muchas excepciones a la herencia materna estricta de la mitocondria hacia la progenie, se ha reportado evidencia de la incorporación de mitocondrias por el lado paterno en la descendencia, en especies que generalmente presentan heredabilidad materna, por ejemplo en ratones (Gyllensten *et al.* 1991) y humanos (Awadalla *et al.* 1999). Aunado a esto algunas especies presentan una doble herencia del mtDNA, por el lado materno y el paterno. Esta condición puede dar origen a heteroplasmia (presencia de más de un genotipo mitocondrial dentro de una misma célula). Tal condición se ha observado en cocodrilos (Sutherland *et al.* 1998, Griffiths, *et al.* 1996).

La heteroplasmia es inusual entre los animales. Por ejemplo, en una célula humana típica que contiene de 1,000-10,000 mitocondrias, sólo una secuencia de mtDNA usualmente está presente (Hartl 2001).

El mtDNA de los vertebrados, es una molécula circular cerrada, con una longitud de 16-21 kilobases. Está constituido por 37 genes y una región no codificante. En todos los eucariotas estudiados, codifica dos genes de RNA ribosomal, 22 RNAs de transferencia y 13 enzimas involucradas en la síntesis de ATP. Esta región contiene la mayor parte de los elementos reguladores de la replicación y expresión del genoma mitocondrial (Sbisa *et al.* 1997). Aunque generalmente conservado, el orden de los genes en el mtDNA es variable entre algunos grupos de vertebrados. En estos últimos, además de las secuencias codificantes del genoma mitocondrial, se presenta una región mayor no codificante: la región control (Ray y Densmore 2004).Figura 3.

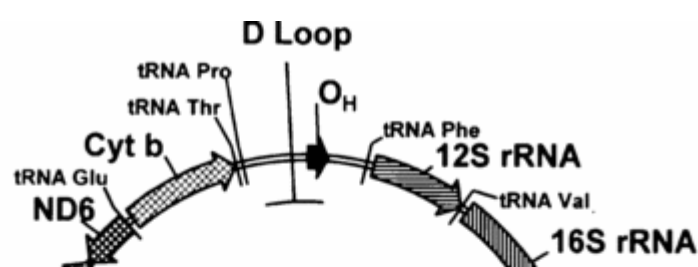


Figura 3. Genoma mitocondrial de humano. O_H and O_L , orígenes de las cadenas de replicación ligera y pesada respectivamente; ND1–ND6, NADH deshidrogenasa (complejo I) subunidades 1–6; Cox1–Cox3, citocromo oxidasa subunidades 1–3 (ETC complejo IV); ATP6 y ATP8, subunidades 6 y 8 de la ATPasa mitocondrial (complejo V); Cyt b, citocromo *b* (complejo III).

Con la aplicación de técnicas moleculares tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación automatizada, la composición y el orden de los genes del genoma mitocondrial de diferentes vertebrados han sido sujetos de intenso escrutinio por parte de diferentes investigadores (Zardoya y Meyer 1998).

La región control del mtDNA (D-Loop) de vertebrados

Esta porción de mtDNA, conocida también como lazo o bucle de desplazamiento (D-loop), generalmente se considera como la parte más variable del genoma mitocondrial, debido a la ausencia de un sistema de reparación del DNA, presente en los segmentos codificantes (Ray y Densmore 2004). Su nombre se debe a la estructura de desplazamiento en forma de bucle de tres cadenas, creada por una naciente cadena pesada que desplaza a la cadena pesada parental. La cadena hija se origina por pequeños segmentos de RNA de la cadena ligera promotora (Light Strand Promoter LSP); inicia en el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y se detiene corriente arriba en el gen tRNA-Pro.

Debido a su reducido tamaño, al conocimiento de sus mecanismos de replicación y transcripción y a la disponibilidad de secuencias de muchas especies, representa un buen modelo para el estudio evolutivo de una región genómica no codificante (Sbisa *et al.* 1997).

Como en el caso de otras regiones control previamente descritas en otras especies, la del orden Crocodylia puede dividirse en tres dominios, siendo el I y el III los más variables. La longitud de la región control en el orden zoológico mencionado varía desde 1,053 pb a 1,197 pb dentro de la familia Crocodylidae y de 987 pb hasta 1,991 dentro de la Alligatoridae.

Quinn y Mindell en 1996 reportaron un rearrreglo de genes codificantes en la región contigua a la región control de cocodrilos, que coloca a la región D-loop entre los genes RNA t-Phe y RNA 12S. En dicha región, particularmente los Dominios I y II a menudo son apropiados para el análisis de poblaciones o individuos dentro de una especie, debido a la alta variabilidad de sus secuencias, mientras que los genes que codifican proteínas, como el citocromo b (Cit b), generalmente son útiles para inferir análisis filogenéticos de taxones arriba del nivel de especie (Ray y Densmore 2002).

La región control en los cocodrilos, ha sido caracterizada por Ray y Densmore en 2002, con tres dominios. El dominio I, generalmente la región derecha (5'-3' de la cadena ligera), es usualmente el más variable, Figura 4.

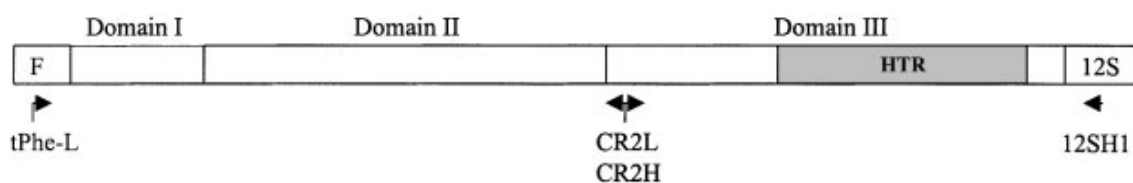


Figura 4. Representación esquemática de la región control de los cocodrilos, indicando los dominios I, II y III. CR2L, tPhe-L, CR2H y 12SH1, son los primers diseñados para amplificar la región control de algunos cocodrilianos (Modificada de Ray y Densmore 2002).

El dominio II es típicamente el menos variable y se ha demostrado que contiene muchas áreas de secuencias altamente conservadas, conocidas como cajas B, C, D, E y F (Ray y Densmore 2002).

El dominio III usualmente contiene el origen de replicación de la cadena pesada (OH), tres bloques de secuencia conservados (Conserved Sequence Blocks, CBSs) y los promotores para la transcripción de las cadenas ligera y pesada (Ray y Densmore 2003).

En la Familia Crocodylidae la región control tiene una extensión que va desde 1,053 pares de bases (pb) a 1,197 pb. Estos tamaños no son absolutos debido a la presencia de elementos repetitivos distribuidos en tandem dentro del dominio III. El dominio II está bien conservado entre las especies del género *Crocodylus*, con sólo 12 % de sitios variables.

La composición nucleotídica de la región D-loop es similar a la observada en otros vertebrados. A+T>C+G en todos los dominios y en todos los taxones sin excepción (Ray y Densmore 2002).

En vertebrados se han documentado las repeticiones heteroplásmicas. En la región control de 11 especies de la Familia Crocodylidae se han identificado dos tipos de secuencias heteroplásmicas repetitivas en el dominio del block de secuencia conservada, (Conserved Sequence Block, CSB) esto es

un segmento extenso de poli-A que parece estar involucrado en la formación de la estructura secundaria y una serie de repeticiones en tandem, que van de 50-80 pb de extensión (Ray y Densmore 2003).

En todos los miembros estudiados de la familia Crocodylidae se ha observado un tracto poli-A, empezando 30 pb debajo de la secuencia CSB-3. La región poli-A varía entre las clonas secuenciadas pero va desde 53 pb en *C. palustris* a 83 pb en *C. rhombifer*. En algunas clonas la región poli-A es seguida por un tracto de nucleótidos dominado por residuos de timina. Este patrón es característico de los cocodrilos del Nuevo Mundo (*C. acutus*, *C. moreletii*, *C. rhombifer*, y *C. intermedius*) y muchas secuencias obtenidas de *C. niloticus* y *C. mindorensis*. Las secuencias repetidas en tandem, seguidas inmediatamente por los segmentos de poli-A o poli-T en todas las clonas, constituyen un segmento amplio (40%-64%) del dominio CSB. En los ejemplares estudiados se observaron dos tipos de variación. El primer tipo de variación se debe a eventos simples o múltiples de inserción/delección en el tracto poli-A. El segundo tipo es por inserción/delección del tandem completo (Ray y Densmore 2003). Estos investigadores mencionan que los tipos de variación observados dentro y entre individuos pueden ser una herramienta útil para los investigadores que realizan trabajos sobre dinámica de poblaciones en cocodrilos, pero debe tenerse cuidado antes de iniciar tales estudios. Se han observado diferencias y frecuencias en el número de secuencias repetidas, en los diferentes tejidos de animales. Todo el DNA aislado para el estudio de Ray y Densmore, fue obtenido a partir de sangre completa, y sugieren que los investigadores que pretendan utilizar la región control para estudios poblacionales deben tener cuidado de obtener el DNA de tejidos idénticos en todos los ejemplares o realizar comparaciones entre tejidos antes de establecer conclusiones (Ray y Densmore 2003).

Estimadores de la Diversidad Genética a nivel de DNA

Para entender el grado de variabilidad que se encuentra en una especie deben considerarse ciertos puntos. La cantidad total de variación genética dentro de una especie (H_T) puede ser dividida entre las diferencias en individuos dentro de una misma población (H_S) y las diferencias genéticas entre diferentes poblaciones (Nei 2000). La proporción total de variación genética dentro de una especie es debida a diferencias entre poblaciones y es generalmente representada por F_{ST} .

Siendo:

$$F_{ST} = 1 - H_S / H_T.$$

La diversidad haplotípica o de Nei (h) es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes, y la diversidad nucleotídica (π) es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes. A continuación se presentan la fórmula de ambos índices:

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

Donde n es el tamaño de muestra, k es el número de haplotipos, p_i y p_j son las frecuencias de los haplotipos i, j , y D_{ij} es la distancia entre éstos.

En resumen, la diversidad haplotípica (h) es la probabilidad de obtener al azar dos secuencias diferentes en una misma muestra y la diversidad nucleotídica (π), se entiende como la probabilidad de obtener al azar dos nucleótidos distintos en la misma muestra (Cedeño 2008).

Redes haplotípicas

Se conoce como red a un conjunto de nodos en donde, para al menos un par de nodos, existe más de un camino que los une. Cuando se realizan trabajos a nivel de genética de poblaciones se opta por el empleo de redes haplotípicas en lugar de árboles filogenéticos, dado que la inferencia cladística de relaciones filogenéticas requiere que las variantes genéticas no formen linajes reticulados (Schaal *et al.* 1998). Las genealogías generadas presentan las relaciones evolutivas entre haplotipos o alelos que permiten reconstruir procesos evolutivos con los principios de la coalescencia, además de considerar predicciones teóricas de genética de poblaciones. La mayoría de los métodos de redes son métodos de distancia, con la intención de minimizar distancias (número de mutaciones) entre haplotipos. Existen diferentes métodos para la generación de redes de haplotipos, entre los cuales se encuentra el método de parsimonia estadística (Guevara 2009).

Método de Parsimonia estadística

El algoritmo de parsimonia estadística comienza estimando número máximo de diferencias entre haplotipos como resultado de simples sustituciones (i.e. aquellas que no son resultado de múltiples sustituciones en un solo sitio) con un 95% de significancia estadística. Este número se denomina límite de parsimonia (o límite de conexión de parsimonia). Después de esto, se conectan los haplotipos que difieren por un cambio mutacional, posteriormente los que se diferencian por dos cambios mutacionales, después por tres cambios, y así sucesivamente hasta que todos los haplotipos se encuentran incluidos en una sola red o hasta que se llega al límite de parsimonia.

Relaciones filogenéticas (Cladogramas)

Para realizar análisis filogenéticos moleculares, se emplean métodos diversos para la construcción de cladogramas para conocer las relaciones entre las poblaciones de la especie. Entre los más utilizados están los cladogramas construidos mediante Neighbor-Joining y Máxima Parsimonia. Los métodos

probabilísticos como la máxima probabilidad han tenido auge ya que incorporan información del modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajuste a los datos, como la distancia de Tamura y Nei (1993) desarrollada analizando las características presentes en la variabilidad intra-específica de la región control del ADNmt humano (*Homo sapiens*) y chimpancés (*Pan troglodytes*) y (variación en la tasa de mutación entre sitios, composición desigual de bases y mayor proporción de transiciones respecto a las transversiones). Además dentro de estos análisis se utilizan diferentes métodos computacionales para encontrar los árboles más adecuados al patrón de secuencias de estudio (Guevara 2009). Entre estos se encuentra el método de **Quartet Puzzling** (Strimmer y Vonhaeseler, 1996). Este algoritmo de *Quartet Puzzling* es un proceso conformado en tres etapas. Primero se evalúa la máxima probabilidad de todos los árboles de 4 haplotipos (cuartetos) con base en un modelo de sustitución nucleotídica. El cuarteto de máxima probabilidad se utiliza como punto de partida para ir añadiendo los otros haplotipos. La evaluación de la rama a la que debe adicionarse el nuevo haplotipo se basa en la máxima probabilidad de los cuartetos que incluyen al nuevo y tres de los haplotipos del cuarteto inicial. Este proceso se repite hasta obtener un árbol que incluya todos los haplotipos (*puzzling step*) presentes en el estudio. En el proceso de adición de haplotipos, pueden ocurrir indeterminaciones en la adición de un haplotipo debido a la coincidencia de máxima probabilidad de dos posibles ramas. En tal caso, se elige al azar una de ellas para añadir el nuevo haplotipo. Cuando el análisis se realiza con muchos haplotipos, esta indeterminación puede producirse varias veces, como consecuencia el proceso de generar árboles (*puzzling step*) se repite un número determinado de veces (10,000 en este estudio) y finalmente la topología definitiva se obtiene a partir del árbol consenso utilizando el principio de mayoría (*majority rule*). Sin embargo la representación final es un árbol de idéntica topología al anterior, pero con una longitud de las ramas calculada con base en los cambios nucleotídicos en cada rama considerando el modelo de sustitución nucleotídica propuesto (Guevara 2009).

Otro método probabilístico reciente es el análisis de inferencia bayesiana aplicado a la reconstrucción de cladogramas (Mau *et al.* 1999). En este método, las inferencias filogenéticas se basan en las probabilidades posteriores de los árboles. El objetivo es buscar el mejor cladograma al cual se ajusten los datos (secuencias) que se tienen (Huelsenbeck, 2000). Para ello, se obtiene la probabilidad posterior de que, dados los datos, determinado nucleótido se localice en cierta posición en un cladograma con cierta longitud de ramas y con determinados nucleótidos como ancestros. Esta probabilidad se calcula con la verosimilitud de la filogenia (donde se utilizan los modelos de sustitución de nucleótidos) y la probabilidad a priori del número de árboles posibles. Dado que la probabilidad a posteriori no puede evaluarse analíticamente, se aproxima al realizar muestras de los cladogramas resultantes a través de las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Yang y Rannala, 1997).

Otro acercamiento al estudio filogenético es el de distancia. Consisten en la idea de conocer la distancia evolutiva actual entre todos los miembros de un grupo de secuencias, entonces sería posible reconstruir la historia evolutiva de todas las secuencias de estudio. El análisis de Neighbor joining es un método heurístico para la estimación de árboles filogenéticos con una evolución mínima (Guevara 2009).

Estudios de Genética poblacional en el Orden Crocodylia

A nivel mundial se han realizado diferentes estudios de genética de poblaciones en cocodrilos empleando diferentes marcadores. En 1977 Gartside y Dessauer investigaron el polimorfismo en proteínas (50 *loci*) del aligador americano (*Alligator mississippiensis*), en donde sólo la lactato deshidrogenasa muscular y una peptidasa fueron polimórficas. Estos resultados permitieron sugerir que los aligadores poseen de los niveles más bajos de diversidad genética entre los vertebrados (Dessauer *et al.*, 2002).

Se ha reportado que los microsatélites muestran ser altamente polimórficos en una amplia variedad de mamíferos y que podrían ser informativos como marcadores genéticos en aligadores. *Loci* microsatélite altamente polimórficos han contribuido a resolver interrogantes relacionadas con la genética de poblaciones en cocodrilos. Por ejemplo, Glenn *et al.* en 1998, desarrollaron los pares de iniciadores para 15 *loci* microsatélites de *A. mississippiensis* (muchos de los cuales contenían repeticiones de dinucleótidos), de los cuales 11 resultaron polimórficos. Los niveles de heterocigocidad para esos *loci* fueron casi 20 veces más altos que para aquellos obtenidos con aloenzimas. Dieciséis alelos fueron detectados en un locus en una muestra relativamente pequeña de aligadores. Las poblaciones a través de todo el rango de distribución del aligador americano pueden ser distinguidas entre sí por alelos únicos o por la diferencia en las frecuencias de *loci* de los microsatélites (Dessauer *et al.*, 2002).

En 2002 se desarrollaron iniciadores para 16 microsatélites para dos especies del género *Crocodylus*. Algunos de estos iniciadores han probado ser de utilidad en otras especies de cocodrilos (FitzSimmons *et al.* 2002). Se demostró que los iniciadores desarrollados por FitzSimmons para *Crocodylus johnstoni* pueden emplearse de manera exitosa para examinar polimorfismo y estructuras poblacionales en *Crocodylus moreletii* (Dever y Densmore 2002; Isberg 2004).

Aunque el ADN mitocondrial ha sido ampliamente usado en estudios poblacionales de otros grupos taxonómicos y en análisis filogenéticos, pocos estudios de variación entre y dentro de poblaciones de cocodrilos han sido completados. Se ha secuenciado el genoma mitocondrial completo del *A. mississippiensis* y del *Caiman sclerops*, lo cual ha permitido que se diseñen iniciadores específicos para amplificar la región control de cocodrilos (Janke y Arnason 1997).

Los estudios realizados con DNA permiten conocer las relaciones genéticas y la historia evolutiva de diferentes especies. Los análisis de secuencias de DNA ortólogas entre especies puede proveer información sobre filogeografía, estructura poblacional e historia poblacional (Glenn *et al.* 2002).

Al investigar secuencias del DNA mitocondrial de *A. mississippiensis* desde el cit b hacia ARNt thr, se encontró que dichas secuencias eran idénticas en 24 de los 25 individuos investigados. En esta especie también se estudió un fragmento de la región D-loop, encontrando una diversidad nucleotídica baja ($\pi = 0.00037 \pm 0.00050$) (Glen *et al.*, 2002).

En un estudio realizado con *C. moreletii* de Belice, Guatemala y el estado mexicano de Tabasco, se encontró la evidencia de hibridación con la especie *C. acutus*. Estudiando un fragmento de ADNmt de 540 pb, se observó que en un clado todos los haplotipos presentes eran originados en *C. acutus* y no en *C. moreletii* (bootstrap = 95%). La diversidad haplotípica (*h*) para las 140 muestras originales fue de

0.502 ± 0.048 y 0.251 ± 0.055 para los haplotipos del tipo *C. moreletii*, es decir, sin incluir los haplotipos del tipo *C. acutus*. Se estimó una diversidad nucleotídica intermedia para *C. acutus* (0.013 ± 0.007) y baja para los haplotipos del tipo *C. moreletii* (0.00072 ± 0.00073) (Ray y Densmore 2004).

En la Península de Yucatán, México se han reportado bajos niveles de sustitución nucleotídica con sólo dos sitios variables en *C. acutus* y 4 en *C. moreletii*. Los índices de diversidad genética obtenidos con la región tRNA-Pro y tRNA-Phe D-loop fueron bajos en ambas especies, con $h = 0.6722 \pm 0.0229$ para *C. acutus* y $h = 0.3617 \pm 0.0728$ para *C. moreletii*. Los niveles de π para la primera especie fueron de 0.0017 ± 0.0014 y de 0.0020 ± 0.0015 para la segunda. Se reportaron tres haplotipos para *C. acutus* y cuatro para *C. moreletii* (Cedeño-Vásquez 2008).

El estudio de poblaciones a nivel molecular ha permitido, entre otros aspectos prácticos dentro del área de la conservación de especies silvestres, la rápida identificación de especies mediante técnicas forenses a partir de carne y/o piel, de manera que se tomen las medidas pertinentes en cuanto a comercialización y exportación ilegal de productos de especies amenazadas (Chung *et al.* 2002; Yan *et al.* 2005).

Implicaciones en Conservación

La conservación biológica puede interpretarse como un intento de proteger la diversidad genética, la cual es producto de la evolución de los previos tres mil quinientos millones de años (Eisner *et al.* 1995). La diversidad genética, es considerada como una de las tres formas de biodiversidad reconocidas por la IUCN, que merecen medidas para ser conservadas, junto con la diversidad de especies y ecosistemas (McNeely *et al.* 1990). Las implicaciones de la relación entre diversidad genética y conservación se pueden considerar en diferentes niveles: genes, individuos, poblaciones, especies, géneros (Allendorf 2003).

En tiempos actuales se presencian una serie de extinciones de especies de flora y fauna sin precedentes. Se ha estimado que las tasas de extinción actuales son 50-500 veces mayores que las ocurridas en el pasado sin la intervención de la especie humana y que anualmente se extinguen de 3,000-30,000 especies de flora y fauna (Woodruff 2001). Las tasas de extinción calculadas para todas las especies del mundo entre los años 2015 y 2020 van del 5 al 25% (Myers y Knoll 2001). Aproximadamente 25% de los mamíferos, 11% de las aves, 20% de los reptiles, 34% de peces y del 9-14% de las plantas superiores estarán amenazadas con la extinción dentro de unas pocas décadas. Más del 50% de las especies animales están consideradas como críticamente amenazadas, amenazadas o vulnerables de extinguirse (IUCN 2001).

Actualmente la biología de la conservación enfrenta problemas que ponen en riesgo la continuidad de la vida incluida la especie humana sobre la biosfera. Los problemas son complejos ya que no es posible un acercamiento mediante métodos reduccionistas que han funcionado de manera óptima en otras áreas de la ciencia. Las soluciones a estos problemas requieren un ajuste de los sistemas políticos y sociales y

una de las herramientas básicas para lograr éste cambio radica en la educación de los diferentes niveles de la sociedad (Pimm *et al.* 2001).

En la actualidad cerca de 15 especies de cocodrilos, se explotan de manera comercial dentro de la industria de la peletería. Es en este rubro donde radica la importancia comercial de este grupo de reptiles a nivel mundial, sobre todo en Los Estados Unidos de América, Italia, Francia, Alemania, China y Japón, en donde existe una industria de la piel basada en las confecciones manufacturadas a partir de cocodrilo. En el Lejano Oriente hay demanda local por la carne de estos animales para consumo humano. La caza furtiva y la destrucción de hábitats han puesto a las poblaciones de diferentes especies de cocodrilos en vías de extinción (Mader 2006).

Justificación

El estudio de los crocodilianos, a escala mundial, abarca un amplio número de áreas del conocimiento, como lo son: taxonomía, paleontología, ecología, biología (por ejemplo determinación de sexo por temperatura), filogenia y sistemática, evolución, zoogeografía, citogenética, genética de poblaciones, etología, bioquímica, fisiología. Además de ser utilizados como modelo biológico en investigación biomédica. Todas estas áreas de investigación tienen entre otros objetivos la conservación incluyendo el aprovechamiento y uso sustentable de las especies y su hábitat, procurando el mantenimiento de los cocodrilos como recurso natural renovable (SEMARNAP 1997).

En México existen pocos trabajos publicados sobre genética poblacional de las diferentes especies de cocodrilos que se encuentran en territorio nacional, por lo que se hace necesario el desarrollo de investigaciones tendientes a conocer el estatus genético de las poblaciones de este grupo de reptiles. El conocimiento generado a través de dichos trabajos permitirá establecer estrategias de manejo y conservación congruentes con la situación particular observada, para de ésta forma conservar el recurso viable para su aprovechamiento en el largo plazo.

El presente trabajo se realizó en el Estado de Oaxaca, en donde no se han llevado a cabo estudios de genética molecular que permitan conocer el estatus genético de la especie de estudio (*Crocodylus acutus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

Durante los primeros meses del año 2008 se realizaron ante la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) los trámites correspondientes para la obtención del Permiso de Colecta Científica de tejidos animales: SGPA/DGVS/00510/08. Asimismo se realizaron los contactos necesarios para la realización de las capturas y colecta de muestras en diferentes localidades e instituciones tales como: Centros de Investigación de Vida Silvestre “David Montes Cuevas” ubicado en Chacahua, Oaxaca y Los Reyes La Paz ambos dependientes de la SEMARNAT; Sociedad de Servicios Ecoturísticos La Vainilla y La Ventanilla Oaxaca.

Para la obtención de muestras se acudió a tres localidades ubicadas en la región costera del Estado de Oaxaca conocida como Costa Chica en el Océano Pacífico. El Parque Nacional Lagunas de Chacahua fue la primer área natural protegida decretada en el país. En el mencionado parque hasta hace unos años se encontraba de manera abundante el cocodrilo de río. El área natural protegida se localiza en la porción central de la costa sur del Estado de Oaxaca, en la región hidrológica RH-21, denominada Costa de Oaxaca y en colindancia de la región hidrológica RH-20 denominada Costa Chica Río Verde; sus coordenadas geográficas son 15°57'0.37" y los 16°03'05.96" de latitud norte y los 97°48'01.01" y 97°31'57.15" de latitud oeste. Esta región se caracteriza por presentar humedad variable, con un periodo considerable de sequía que va de los cinco a los nueve meses, con precipitaciones de 600 a 1500 mm y temperatura superiores a los 25°C a lo largo del año. Estas condiciones determinan que el trópico subhúmedo esté constituido principalmente por selvas secas de gran diversidad botánica pero de poca o mediana altura, cuyos árboles pierden el 50% de sus hojas durante la época de estiaje (Pérez 2002) (Cuadro 1 y Figura 5).

Cuadro 1. Localidades de Muestreo en la región costera del Estado de Oaxaca.

Estado	Localidad	Coordenadas	Distancia entre localidades
Oaxaca	Estero La Vainilla	15°45'09.14" N 96°46'45.89" O	Chacahua-Vainilla 95.37 km
Oaxaca	Estero La Ventanilla	15°40'17.08" N 90°34'47.26" O	Chacahua-Ventanilla 117.26 km
Oaxaca	Laguna de Chacahua	15°58'06.94" N	Vainilla-Ventanilla 21.71 km

97°41'12.30''O



Figura 5. Localidades de muestreo en la Costa del Estado de Oaxaca.

Modalidades de captura de cocodrilos

La captura de cocodrilos en vida libre se realizó mediante dos variantes: diurna y nocturna.

La primera se realizó mediante el tendido de trasmayo (red) en ambos lados de los canales de tránsito. Al entrar en contacto con la red, el movimiento de la misma permitió la ubicación de los animales. Con la ayuda de pertigas y lazos los animales se sacaron del agua y se aseguró hocico y patas para su traslado a la orilla y realizar la toma de muestras sanguíneas.

La captura nocturna se lleva a cabo mediante localización de los ejemplares con la ayuda de lámparas frontales de 50,000 a 200,000 candelas. El reflejo del *tapetum lucidum* permitió la ubicación de los animales. El acercamiento a los mismos se realizó en lancha (conocidas en la región como cayuco o panga, sin son de fibra de vidrio las primeras o madera las segundas) impulsada por remos. Se capturaron los ejemplares con la ayuda de pertigas y lazos en el caso de individuos subadultos, las crías se sujetaron con la mano directamente de acuerdo con Webb y Messel (1977).

Toma de muestras sanguíneas

Se logró la captura en vida libre de 20 ejemplares. (Tabla 2) Al ser capturados los ejemplares se trasladaron a la orilla para la toma de muestras sanguíneas. Para la extracción de sangre se emplearon agujas para tubos Vacutainer® de los números: 18, 20, 21 y 25, (esto en función de la talla del ejemplar) adaptador para tubo Vacutainer® con anticoagulante EDTA K3 de 3 y 4 ml. Los vasos sanguíneos puncionados fueron, el seno venoso occipital y/o la vena coccígea, de acuerdo a lo sugerido por Mader (2006). Todas las muestras obtenidas de la localidad Lagunas de Chacahua en Oaxaca, pertenecen a animales que se encuentran dentro de las instalaciones del Centro de Investigación y Conservación de Vida Silvestre CIVS “David Montes Cuevas”, dependiente de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT. Todos los ejemplares elegidos para la toma de muestras proceden de vida libre. Sin embargo, en ésta localidad del Estado de Oaxaca se presenta una situación particular por la presencia de individuos que presentan el fenotipo de la especie *C. moreletii*. El cocodrilo mencionado no forma parte de la herpetofauna de la región, por lo que se obtuvieron muestras sanguíneas de ejemplares de la Especie acutus pero con características fenotípicas de *C. moreletii*, tales como escamas caudales ventrales con línea discontinua, con la finalidad de detectar haplotipos híbridos.

Cuadro 2. Muestreo por localidad

Localidad	Macho	Hembra	Sin sexar	TOTAL
La Vainilla			4	4
La Ventanilla	6	4	0	10
Lagunas de Chacahua	2	4	0	6
TOTAL POR SEXO	8	8	4	20

Trabajo de laboratorio

Previo al procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Genética Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, las muestras fueron congeladas a -20° C en el congelador de la institución.

Identificación de las muestras

A lo largo del presente trabajo los diferentes animales son identificados mediante las primeras letras del nombre de la localidad en donde fueron capturados y un número. Así: Cha= Chacahua, Va= Vainilla y Ven= Ventanilla.

Extracción y visualización de ADN genómico total (ADNt)

A partir de un volumen de sangre completa de 1,000 µl, para separar el paquete leucocitario del resto de los componentes sanguíneos se requirió centrifugar a 3,000 rpm durante 15 minutos. Con pipeta Pasteur se extrae

la capa flogística (un volumen de aproximadamente 200 μ l) y se almacena a -70° C, previa adición de glicerol al 10% para preservar el DNA. Una vez aislado el paquete celular se realizó el procedimiento para la extracción de tDNA, utilizando el estuche comercial QIAamp^{MR} tDNA de QIAGEN para éste fin, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Dicho método produce ADN de alto peso molecular (aproximadamente 100 ng) apropiado para amplificación empleando protocolos estándar de PCR.

Mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5%, se realizó el corrimiento del tDNA para su visualización, utilizando 6 μ l, y corriendo paralelamente el marcador molecular de referencia lambda (λ) (PROMEGA 2.5 kb, 7 μ l), tanto al tDNA como al marcador λ se le adicionaron 2.5 μ l buffer de carga y se sometieron a 95 V por 60 minutos.

Posteriormente el gel se colocó en solución de Bromuro de etidio (EtBr) (50 ppm) para visualizar el tDNA en un equipo Capture and Image System Multi Genious Bio Imaging System

Amplificación de la región de interés vía PCR mediante el empleo de la *Taq* polimerasa.

Se amplificó un fragmento de mtDNA de 499 bases, que incluye desde el sitio 166 hasta el 477 de la región control. Se utilizó el kit comercial GoTaq^{MR} PCR Core System I de Promega^{MR}. Para llevar a cabo al amplificación de DNA se sintetizaron dos pares de iniciadores utilizados por Ray y Densmore en 2002: 1) el par de iniciadores CR2L (5'-CGT TAT ACA TAT TAC TCT TTA ATT AGG CCC CC-3') y 12SH1 (5'-GTT GAG CAG TAG CTA ATA ATA AGG TCA GGA-3') para amplificar un fragmento de aproximadamente 1,000 pb; 2) el par tPhe-L (5'-GAA CCA AAT CAG TCA TCG TAG CTT AAC-3') y CR2H (5'-GGG GCC ACT AAA AAC TGG GGG-3'), para amplificar un fragmento de 700 pb. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las reportadas por Ray y Densmore en 2002 en 25 μ l de reacción, conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.1 % Triton 100, 1 mM MgCl₂, 0.15 μ M de cada dNTP, 0.2 μ M de cada primer, y 1U de *Taq* polimerasa. Las condiciones que se emplearon para el termociclador fueron establecidas de acuerdo al protocolo de amplificación publicado por los autores antes mencionados, con las siguientes modificaciones: 3 ciclos de 95°C por un minuto, 57.7°C por un minuto (en éste paso los autores reportan una temperatura de 56°C), 72°C por 1.5 minutos, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, y 57.7°C por 30 segundos(en éste paso los autores reportan una temperatura de 57°C). Esto es seguido de una elongación final de 1 minuto a 72°C, las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador de la marca BIO-RAD modelo Mycycler.

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio en un equipo Multi Genios Bio Imaging System de Syngenic. Figura 6.

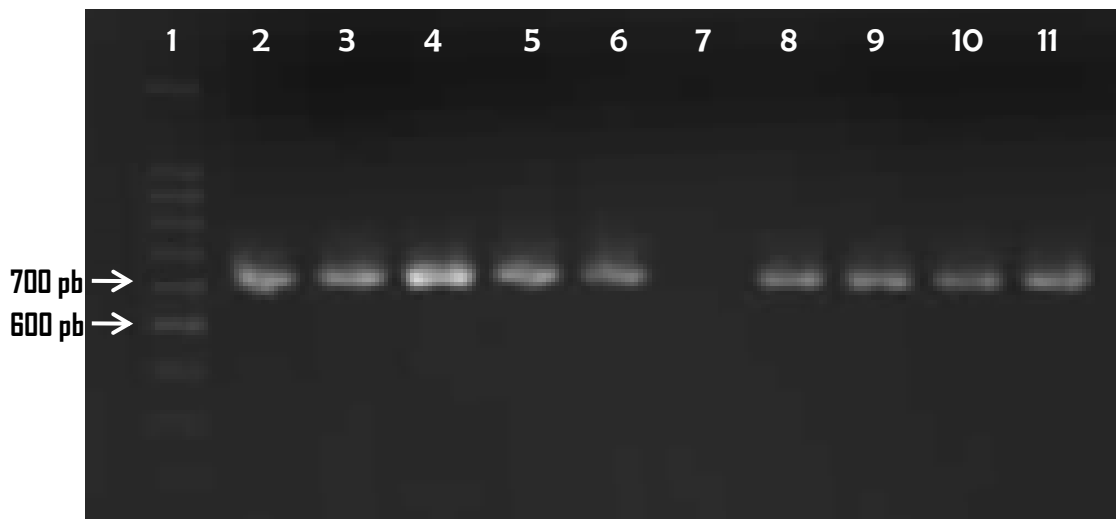


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5%. Amplificación de productos de PCR de aproximadamente 700 pb. Carril 1 marcador de 100 pb. En los carriles marcados como el 2 hasta el 6 se encuentran los fragmentos correspondientes a los organismos: Va1, Va2, Va3, Va5, Cha1 y de los carriles 8 a 11 son los organismos: Ven4, Ven7, Ven11 y Ven13.

Purificación de los fragmentos amplificados

Para la purificación de los fragmentos amplificados se utilizó el estuche comercial para purificación de productos de PCR a partir de gel (Wizard SV Genomic DNA Purification System Promega^{MR}), siguiendo el protocolo de la empresa fabricante. Las muestras se almacenaron a 4° C. El resultado de la purificación se visualizó en gel de agarosa al teñido con Bromuro de Etidio, en un equipo Multi Genius Bio Imaging System de Syngenic. Figura 7.

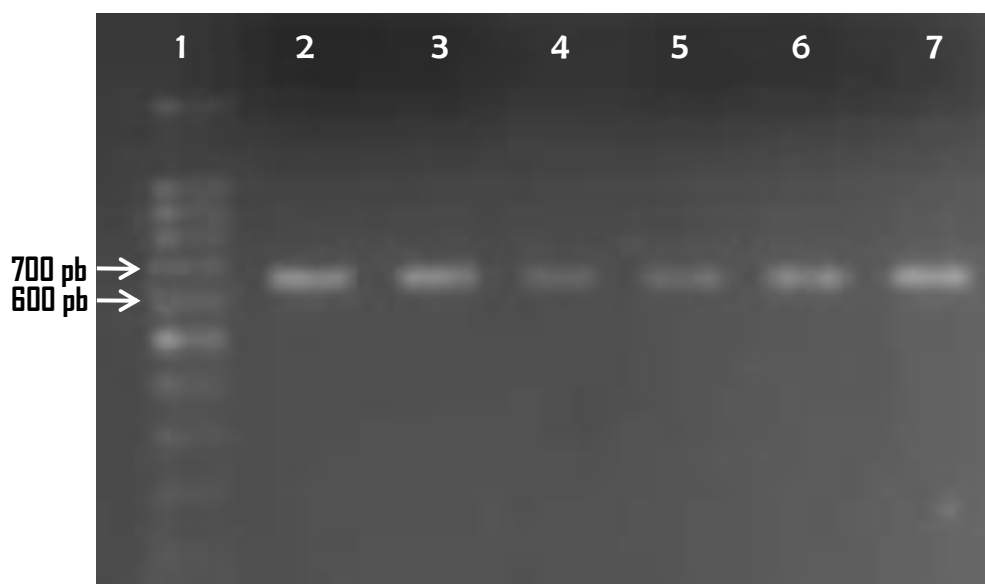


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5%. Purificación de productos de PCR de aproximadamente 700 pb a partir de gel. Carril 1 marcador de 100 pb. En los carriles marcados como el 2 hasta el 7 se encuentran los fragmentos correspondientes a los organismos: Va1, Va2, Va3, Va5, Cha1 y Ven4.

Secuenciación de productos amplificados de la región control mitocondrial

Para las reacciones de secuenciación se empleó el estuche comercial Big Dye Terminador v 3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems^{MR}, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Posteriormente los productos secuenciados fueron purificados mediante columnas con Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) y agua para reacciones de PCR.

Una vez purificados los productos de secuenciación, se enviaron para el proceso de lectura en un Secuenciador Automático de 4 capilares escalable a 16 ABI Prism-3100 Avant del Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (LDBM) de la UAM-Iztapalapa.

Trabajo de Gabinete

La visualización y edición de los electroferogramas de las secuencias en los sentidos 5'-3' y 3'-5 se realizó mediante la utilización del programa CHROMAS v. 1.45 (McCarthy 1996-1998), para revisar la correspondencia en ambas direcciones y generar una secuencia consenso.

Posteriormente y mediante un análisis de BLAST (Altschul *et al.*, 1997), se confirmó la identidad de las secuencias. Una vez verificadas las secuencias, fueron alineadas haciendo uso del paquete Clustal IX (Thompson *et al.*, 1997) implementado en BioEdit v7.0.9. (Hall, 1999). Para la alineación se utilizaron como referencia secuencias homólogas de las especies *C. acutus* (AY568308-AY568317) y *C. moreletii* (AY136686-AY136738 y AY341444-341530), publicadas en la base de datos del GenBank de la NCBI (Nacional Resource for Molecular Biology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), con la finalidad de comparar las secuencias obtenidas con las publicadas en la base de datos.

Para fines de identificación a los códigos de acceso de Genebank que inician con las letras AY se agregó una M en los diferentes análisis para los individuos identificados como pertenecientes a la especie *C. moreletii* y una A para los identificados como *C. acutus*. Asimismo para los análisis de filogenia se incluyeron tres secuencias de otras tres especies. De la misma forma la secuencia de *C. niloticus*, *C. intermedius* y *C. rhombifer* se identifican como NAY, IAY y RAY respectivamente.

Relaciones filogenéticas e identidad de las secuencias estudiadas

Las relaciones filogenéticas e identidad de las especies analizadas se infirió a partir de una búsqueda BLASTN, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Primeramente se determinó el mejor modelo de evolución

nucleotídica a partir del método y programa ModelTest 3.06 program (Posada y Crandall 1998). Se utilizaron los haplotipos resueltos para las secuencias homólogas de las especies *C. acutus* (AY568308-AY568317) y *C. moreletii* (AY136686-AY136738 y AY341444-341530), así como las secuencias de las especies *C. rhombifer* y *C. intermedius* que pertenecen al Continente americano además de *C. niloticus* una especie africana, como grupos de referencia/externos.

Se obtuvieron cladogramas por medio de los métodos de Máxima Probabilidad (MP) (Felsenstein, 1973; 1981) y Bayesianos (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). El nivel de confianza de la topología de MP se estimó mediante *Quartet Puzzling* (10,000 pasos) definido en Strimmer y Vonhaeseler (1996). Estos análisis se llevaron a cabo con el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2002). Para los análisis Bayesianos se empleó el programa MrBayes versión 3.0, y se corrieron 1,000,000 de generaciones de 5 cadenas simultáneas usando la técnica de la cadena Markov de Monte Carlo (MCMC). Se realizó un análisis de Neighbour joining, mediante el programa MEGA 4.1 (Tamura, Dudley, Nei y Kumar 2007).

Relaciones haplotípicas de las poblaciones de estudio

Para describir las relaciones entre haplotipos se obtuvieron redes haplotípicas basadas en parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1992; Templeton y Sing, 1993) usando el programa TCS versión, 1.21 (Clement *et al.* 2000). Este programa permite estimar las relaciones filogenéticas cuando se presentan bajos niveles de divergencia (característico de las poblaciones) y provee hasta del 95% de posibles conexiones haplotípicas.

Diversidad genética

Los índices de diversidad utilizados para describir el grado de diversidad genética de las poblaciones estudiadas se calcularon fueron: la diversidad nucleotídica (π), el número de haplotipos (NH) y diversidad haplotípica (h), y el número de sitios segregados o sitios variables entre pares de secuencias, implementados todos en el programa DNAsp (Rozas 2006 (Nei 2000) mediante el Modelo Estadístico de Tajima y Nei 1987.

RESULTADOS

Análisis de secuencias

Búsqueda BLASTN.

A partir de las lecturas de ambas cadenas para cada individuo se generaron secuencias consenso del mtDNA de 499 pb previo alineamiento y corte de las mismas para que se encontraran con una longitud exactamente igual. En el alineamiento se observan los sitio polomórficos de las secuencias Figura 8

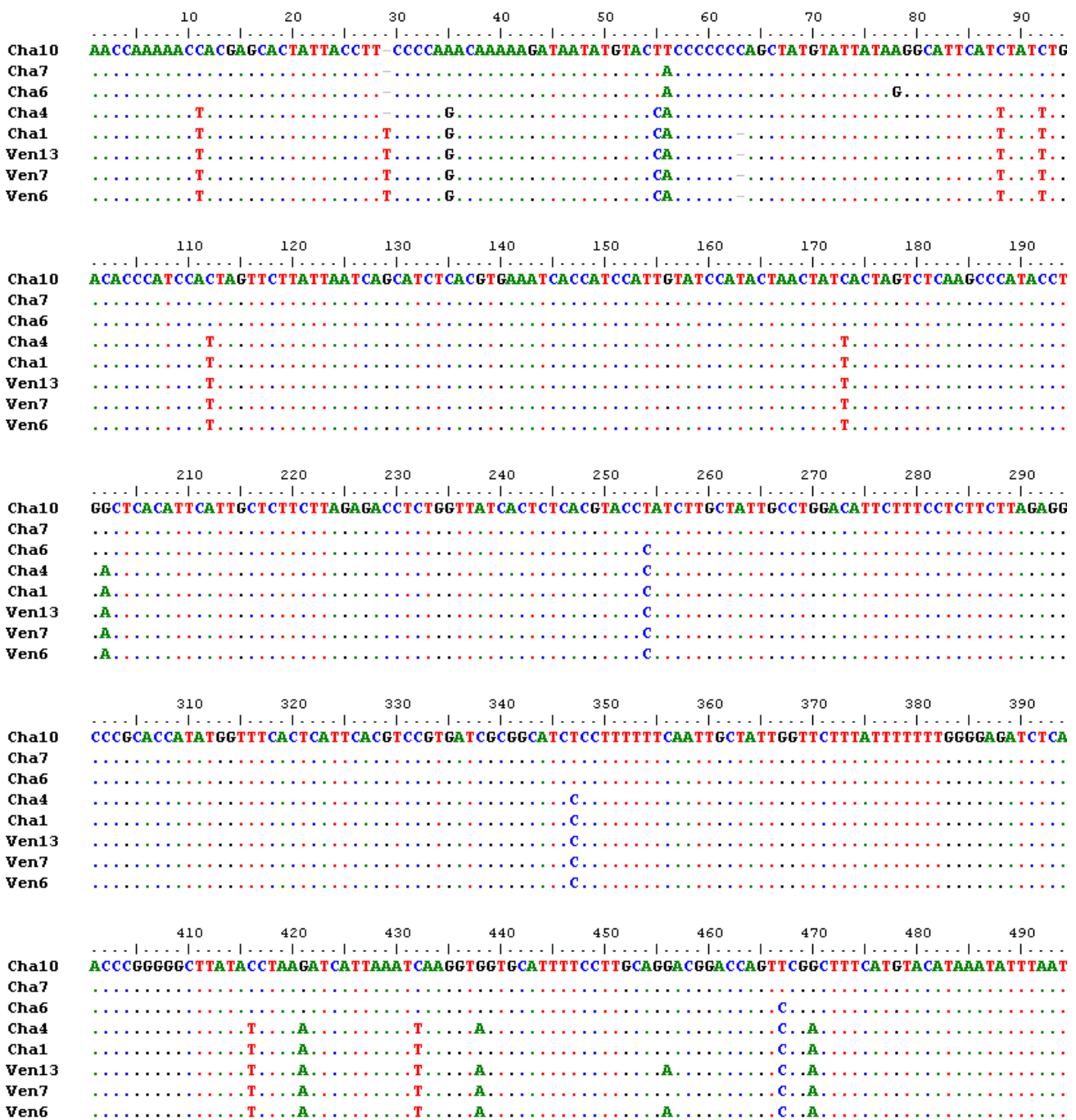


Figura 8. Alineamiento donde se observan los sitio polomórficos de las secuencias analizadas

Con las secuencias obtenidas se generó una búsqueda BLAST para cada uno de los 20 organismos, y mostraron los siguientes porcentajes de identidad: 16 de las secuencias presentaron valores de identidad elevados (99%) con secuencias homólogas de *C. acutus* de la Costa Este de México. Mientras que cuatro individuos de la Localidad de Lagunas de Chacahua presentaron valores de identidad (99%) con *C. moreletii*.

Relaciones filogenéticas e identidad de las secuencias estudiadas

De las secuencias utilizadas de Genbank se resolvieron 20 haplotipos, 16 para *C. moreletii* y cuatro para *C. acutus*, mientras que para las secuencias generadas en el presente estudio se resolvieron 7 haplotipos. Cuadro 3.

Cuadro 3. Distribución de haplotipos de las tres localidades estudiadas

Haplotipo	Localidad	Número ejemplares	Identificación
1	Chacahua	2	Cha10, Cha9
2	Chacahua	1	Cha7
3	Chacahua	1	Cha6
4	Chacahua	1	Cha4
5	Chacahua	3	Cha1, Ven11,
6	Ventanilla y Vainilla	11	Ven2, Ven5, Ven6, Ven8 Ven9, Ven10, Ven13, Va1, Va2, Va3, Va4
7	Ventanilla	1	Ven7
TOTAL		20	

Análisis Filogenéticos

En el diseño, utilizando como grupos externos a las especies *C. niloticus* y *C. rhombifer* el modelo elegido como el más apropiado fue GTR+I model (Rodríguez *et al.*, 1990). Los parámetros de la serie de datos de la región control del mtDNA fueron: frecuencias de bases A = 0.25880, C = 0.28130, G = 0.14260 y T = 0.31730. Los análisis de Neighbor-joining, Máxima Probabilidad con el modelo previamente mencionado y los análisis Bayesiano y de (Figs. 9, 10 y 11 respectivamente) resultaron similares. En los tres árboles se observa la separación hacia dos grupos principales y es de hacer notar que en más de un clado se agrupan individuos de la especie *C. moreletii* con *C. acutus*.

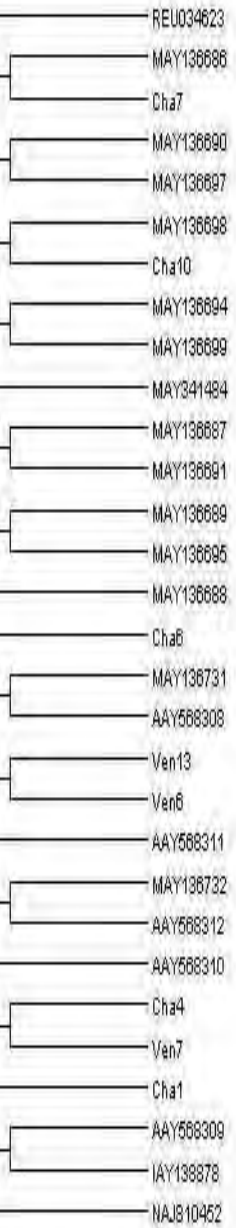


Figura 9. Árbol generado mediante Neighbor-Joining de haplotipos únicos y grupos externos, empleando el modelo GTR+I de distancias genéticas. Números en los nodos indican los valores de bootstrap (1,000 replicas).

0.0010

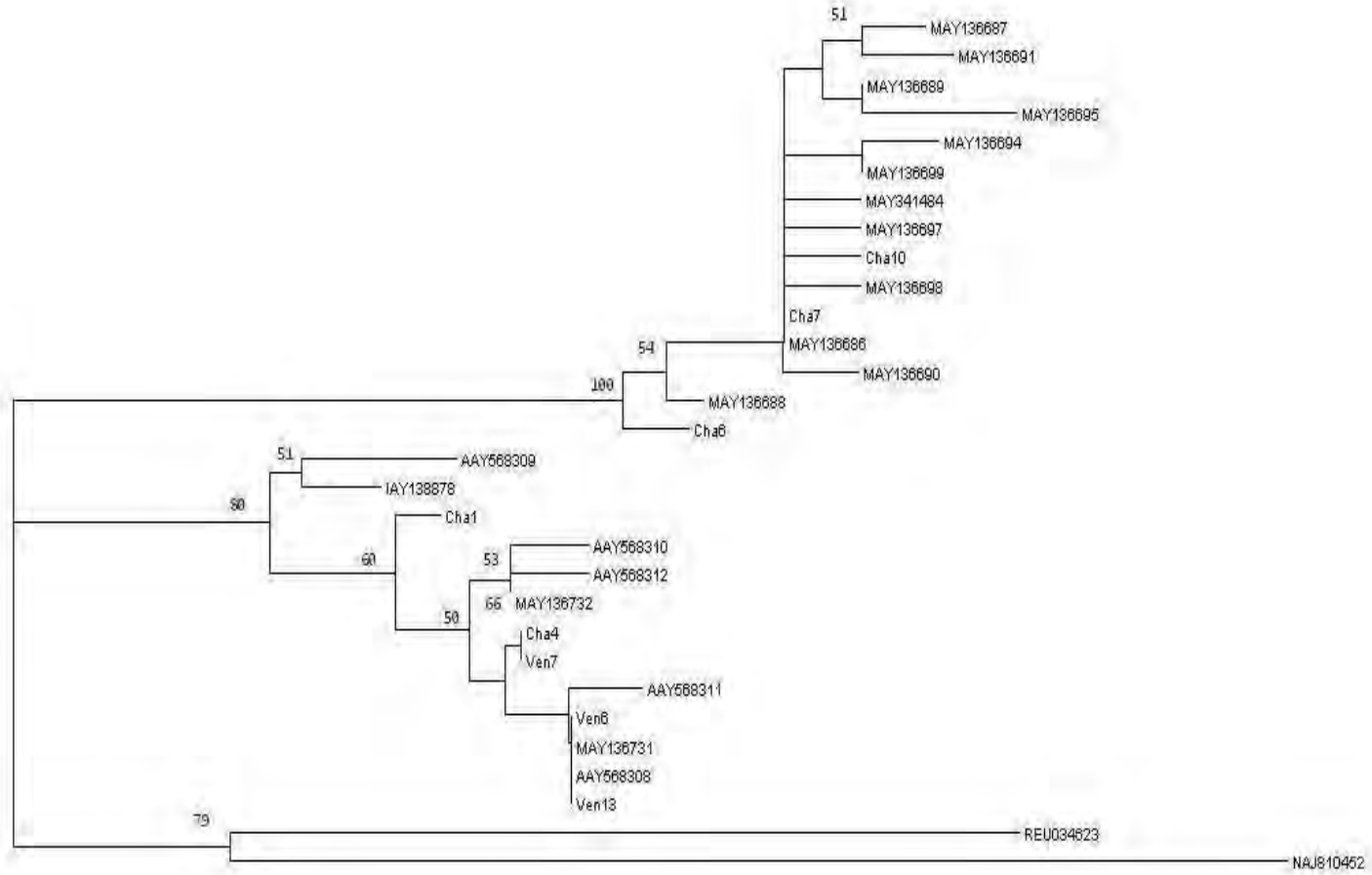


Figura 10. Cladograma generado mediante Quartet Puzzling y computadas con el modelo evolutivo GTR+I. Números en los nodos indican los valores de bootstrap (1,000 replicas).

1000000

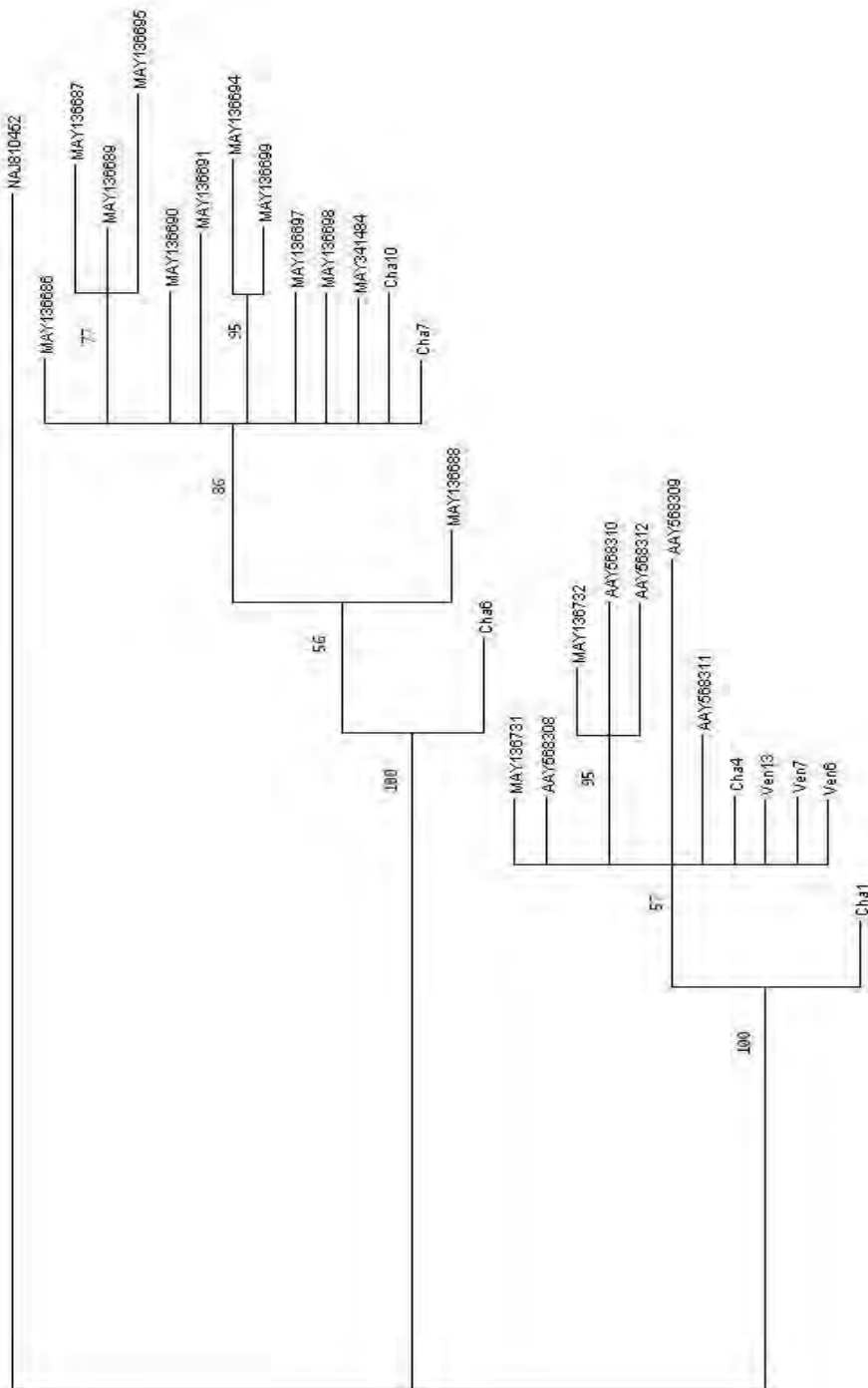


Figura 11. Análisis Bayesiano. Cladograma consenso obtenido a partir de un análisis Bayesiano de los 7 haplotipos de *Crocodilus acutus*, utilizando como grupo externo a *C. niloticus* identificado como NAJ 810452. Arriba de las ramas se presentan las probabilidades Bayesianas *a posteriori*

Red de Haplotipos únicos

En la red haplotípica se observan a su vez dos subredes dado que se superó el límite de parsimonia estadística, cuyos pasos mutacionales son nueve con una confianza del 95%. El número mayor de cambios mutacionales observados fue de 15. Lo anterior sugiere la división del grupo total de secuencias en aparentemente dos especies distintas. En la subred A se ubican todos los organismos que al muestreo presentaron fenotipo de *C. acutus*, mientras que en la subred B, se sitúan los organismos que presentaron características de fenotipo

moreletii. Es de notar el hecho que todas las secuencias en ambas redes presentan como haplotipo más ancestral a individuos de la especie *C. moreletii* de acuerdo a lo reportado en Genebank, el haplotipo Cha7 es el mismo que el del organismo identificado como MAY136686. Fig. 12.

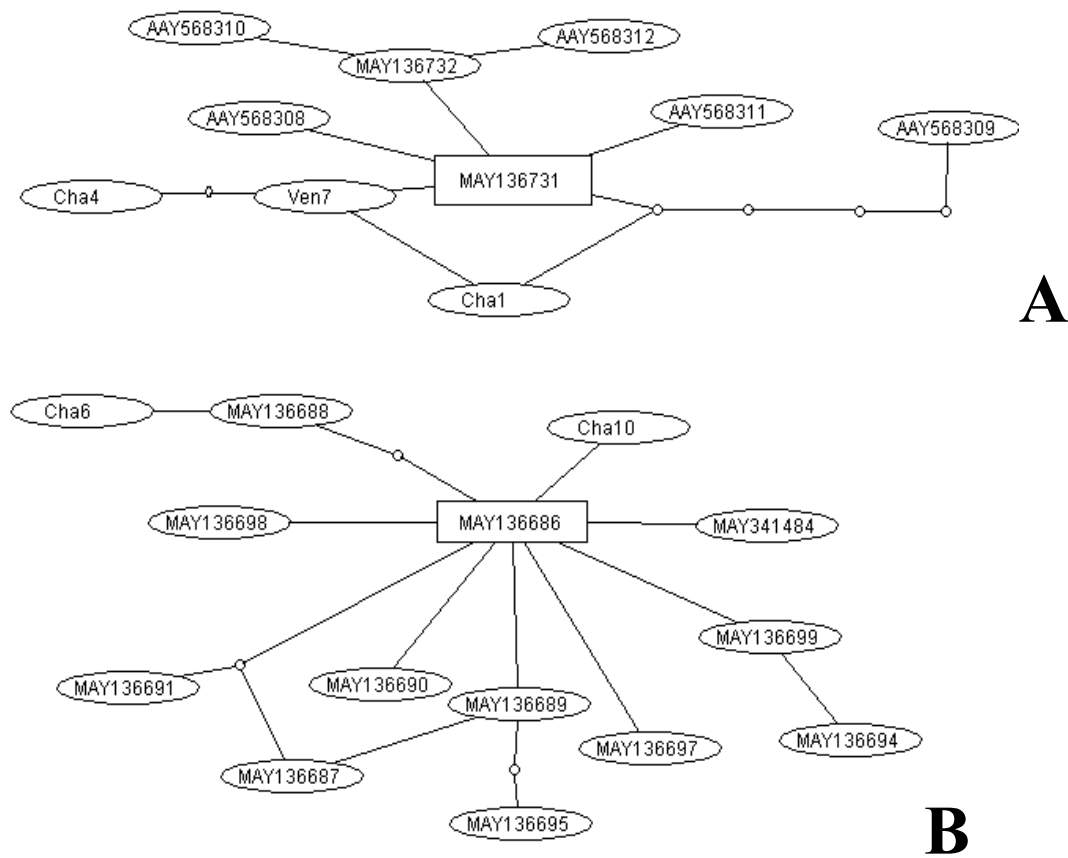


Figura 12. Red de Haplotipos

Relaciones haplotípicas de las poblaciones de estudio

Posteriormente y con base a la confirmación de la identidad de las secuencias, las mismas fueron agrupadas en dos diferentes grupos de datos: a) como un solo grupo de secuencias (N = 20) y b) por agrupación de especies (*C. acutus*, N = 16 y *C. moreletii*, N = 4), asumiendo la identidad resuelta en el análisis filogenético, con la finalidad de determinar los diversos índices de diversidad.

Distribución geográfica de haplotipos de *C. acutus*

Distribución de haplotipos sin considerar los del tipo de *C. moreletii*, únicamente los del tipo de *C. acutus*. Los únicos haplotipos compartidos entre poblaciones son los designados 1A y 3A ya que se encuentran tanto en Ventanilla como en Chacahua el primero y en Ventanilla y Vainilla el segundo. Cuadro 4.

Cuadro 4 Distribución de haplotipos sin considerar los del tipo de *C. moreletii*, únicamente los del tipo de *C. acutus*.

Haplotipo	Localidad	Número de ejemplares	Identificación
1A	Chacahua	3	Cha4, Ven4, Ven11
2A	Chachaua	1	Cha1
3A	Ventanilla y Vainilla	11	Ven2, Ven5, Ven6 Ven9, Ven8, Ven10, Ven13 Va1, Va2, Va3, Va4,
4A	Ventanilla	1	Ven7
TOTAL		16	

Distribución de haplotipos considerando las secuencias que presentaron identidad con *C. moreletii*

En el caso de éstas cuatro secuencias particulares se obtuvieron tres haplotipos. Cuadro 5.

Cuadro 5. Haplotipos del tipo *moreletii*

Haplotipo	Localidad	Número de ejemplares	Identificación
1b	Chacahua	2	Cha9, Cha10
2b	Chacahua	1	Cha7
3b	Chacahua	1	Cha6
TOTAL		4	

De lo presentado en los cuadros anteriores hay que mencionar que de los haplotipos encontrados, cuatro no se habían reportado previamente. Son los siguientes. Cuadro 6.

Cuadro 6. Haplotipos no publicados previamente.

Haplotipo	Localidad	Número de ejemplares	Identificación
1A	Chacahua	3	Cha4, Ven4, Ven11
2A	Chachaua	1	Cha1
1b	Chacahua	2	Cha9, Cha10
3b	Chacahua	1	Cha6
TOTAL		7	

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El haplotipo que se presentó con una mayor frecuencia (11 individuos) fue el denominado como 3A. Dicho haplotipo se encontró en los esteros de la Ventanilla y la Vainilla que se encuentran a una distancia menor a los 20 km. Es probable que exista entre estos dos esteros comunicación e intercambio genético. En éstas zonas costeras no se observaron ejemplares con fenotipo de *C. moreletii*. Cabe destacar que en estas zonas de manglar los cocodrilos son protegidos por la comunidad local dedicada al ecoturismo por más de 30 años. Se realizan cosechas de los nidos y se incuban los huevos bajo custodia de lo habitantes locales. Al alcanzar una talla promedio de 50 cm las crías son liberadas. Este factor humano permitiría la fijación de un haplotipo en particular, además de que la población de individuos reproductores no es muy grande. García –Grajales reportó en 2007, al realizar un estudio sobre tamaño y estructura poblacional, de un total de 163 cocodrilos capturados, sólo 21 eran ejemplares con talla suficiente para la reproducción y de los cuales ocho fueron hembras. La custodia humana puede orientarse de manera inconciente hacia los nidos de la mismas hembras año tras año, dando como consecuencia la parición en la población muestreada de unos cuantos haplotipos.

Haplotipos de *C. moreletii*

Es importante destacar que algunos de los ejemplares de el presente trabajo se agrupan en clados con *C. moreletii* en vez de *C. acutus*. Las secuencias publicadas en Genbank proceden del trabajo de Ray de 2004, en donde se menciona la posibilidad de hibridación entre ambas especies.

En general la diversidad genética encontrada fue baja en el grupo de animales estudiados. En comparación con los resultados obtenidos por Cedeño en 2008 para la especie *acutus* se observa que el número de haplotipos que reporta es de tres, mientras que en nuestro estudio es de siete. Los valores de $\pi = .001700 \pm .00140$ reportados por Cedeño mientras que en el presente estudio $\pi = 0.00118 \pm 0.00034$. Asimismo los valores de h en el estudio de Cedeño son de $h = 0.6722 \pm 0.0229$ y en el presente estudio $h = 0.684 \pm 0.103$. Cuadro 3

El número de haplotipos encontrado en éste estudio es de más del doble, aún cuando el número de individuos es inferior al reportado por Cedeño, los valores de h son similares para ambos estudios. Cuadro 7.

Cuadro 7. Modificada de Cedeño 2008. Comparación de índices de diversidades nucleotídica y haplotípica en trabajos realizados con diferentes especies de cocodrilos. N= tamaño de muestra, pb = número de bases, S= número de sitios variables, H= número de haplotipos, h = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, DE= desviación estándar.

Especie	N	Marcador	pb	S	H	h + DE	π + DE	Fuente
<i>Alligator mississippiensis</i>	25	Cit-b+D-loop	1,317	3	4	.3130±.3320	.000240±.00028	Glenn <i>et al.</i> (2002)
<i>Caiman crocodylus</i>	125	Cit-b	1,085	41	38	.7330±.0420	.001169±.00082	Vasconcelos <i>et al.</i> (2006)
<i>Caiman crocodylus</i>	32	Cit-b	1,142	9	9	.6920±.0790	-	Farias <i>et al.</i> (2004)
<i>Melanosuchus Níger</i>	47	Cit-b	871	11	10	.7150±.0490	-	Farias <i>et al.</i> (2004)
<i>Crocodylus moreletii</i>	112	D-loop	~540	-	16	.2510±.0550	.000720±.00073	Ray <i>et al.</i> (2004)
<i>Crocodylus moreletii</i>	56	D-loop	477	4	4	.3617±.0728	.002000±.00150	Cedeño (2008)
<i>Crocodylus acutus</i>	43	D-loop	477	3	3	.6722±.0229	.001700±.00140	Cedeño (2008)
<i>Crocodylus acutus</i>	35	D-loop	548		2	.1079±.0680	.000200±.000272	Sánchez (2007)
<i>Crocodylus acutus</i>	16	D-loop	499	19	7	.684 ± .0103	.00118± 0.00034	Éste trabajo (2010)

Al comparar entre sí los resultados de los diferentes trabajos con el presente estudio se observó que en éste último se presenta una variabilidad nucleotídica de $\pi = .00118 \pm 0.00034$, similar a la reportada por Vasconcelos *et al.* en 2006 para *Caiman crocodylus*, pero, empleando en éste último al Cit-b como marcador. La diversidad haplotípica encontrada en éste trabajo ($.684 \pm .0103$) es similar a la reportada por Cedeño en 2008, $h = .6722 \pm .0229$.

Como puede observarse en los resultados de manera general la variabilidad observada es baja, lo cual es concordante con otros estudios realizados previamente en diferentes especies de cocodrilos.

De acuerdo con estudios poblacionales previos en cocodrilos, se observan índices de diversidad muy bajos en comparación con otros grupos de vertebrados. En general los ordenes Crocodylia y Quelonia, que comparten una historia evolutiva de millones de años, presentan una variabilidad genética baja. Por ejemplo los niveles de π a lo largo de todo el rango de distribución del alligator americano puede compararse con la diversidad observada en la tortuga caiman (*Macrolemys temminckii*) en diferentes ríos a lo largo de la Costa del Golfo de México. Los niveles de variación observados en *A. mississippiensis* están abajo que los observados en anfibios, peces, mamíferos e incluso otros reptiles. El único reptil conocido que comparte niveles similares de variación, empleando como marcador la región control del mtDNA es la especie de tortugas mencionada en un principio (Glenn *et al.* 2002). Cuadro 8.

Cuadro 8. Comparación de la diversidad nucleotídica del ADNmt del alligator americano con fragmentos conteniendo el Dominio I de la región control de otras especies.

Especies	Tamaño de muestra	Pares de bases	π	Referencia
<i>Alligator mississippiensis</i>				
Región control	25	458	0.00034 ± 0.000054	Glenn <i>et al.</i> 2002
Fragmento de D-loop	25	624	0.00037 ± 0.00050	Glenn <i>et al.</i> 2002

Cit b + fragmento de D-loop	25	1317	0.00024±0.00028	Glenn <i>et al.</i> 2002
Cit b + fragmento de D-loop	25	1823	0.00017±0.00020	Glenn <i>et al.</i> 2002
Tortugas				
<i>Chelydra serpentina</i>	66	409	0.00056±0.00073	Walter <i>et al.</i> 1998
<i>Deirochelys reticularia</i>	50	436	0.006± no reportada	Walter y Avise 1998
<i>Kinosternidae flavescens</i>	14	432	0.039± no reportada	Serb <i>et al.</i> , 2001
<i>Kinosternidae flavescens</i>	10	432	0.006± no reportada	Serb <i>et al.</i> , 2001
<i>De planicie</i>				
<i>Macroclmys temminckii</i>	158	420	0.0145± no reportada	Roman <i>et al.</i> , 1999
<i>Sternotherus depressus</i>	6	402	0.007± no reportada	Walter <i>et al.</i> 1998
<i>Sternotherus minor</i>	52	430	0.017± no reportada	Walter <i>et al.</i> 1995
Aves				
<i>Dendroica petechia</i>	155	344	0.0172±0.0006	Milot <i>et al.</i> , 2000
<i>Grus canadensis</i> , grupo A	23	386	0.0261±0.0138	Glenn <i>et al.</i> , 2002
<i>Grus canadensis</i> , grupo B	37	392	0.0139±0.0076	Glenn <i>et al.</i> , 2002
<i>Oporornis tolmiei</i> , USA	101	339	0.0082±0.0048	Mila <i>et al.</i> , 2000
Felinos				
<i>Acinonyx jubatus</i>	20	320	0.0131± no reportada	Freeman <i>et al.</i> , 2001
<i>Felis catus</i>	2	320	0.0416± no reportada	Freeman <i>et al.</i> , 2001
<i>Leopardus pardales</i>	20	320	0.0522± no reportada	Freeman <i>et al.</i> , 2001
<i>Leopardus wiedii</i>	11	320	0.0745± no reportada	Freeman <i>et al.</i> , 2001

En la actualidad se piensa que los bajos niveles de variabilidad genética observados en diferentes especies de cocodrilos han sido determinados por factores medioambientales y pueden ser indicadores de una selección natural direccional. Con esto nos referimos a que cierto genotipo puede verse favorecido (Flint *et al.* 2000). Puede pensarse en una adaptación a determinadas nichos dentro de un ambiente relativamente estable (Lawson *et al.* 1989). Si la fijación de genes responde a periodos largos de estabilidad ambiental, los altos niveles de homocigocidad pueden no ser una desventaja, debido a que este es un aspecto de adaptación óptima. (Gartside *et al.* 1977). Es posible que los cocodrilos hayan permanecido como un grupo de depredadores acuáticos dada la gran variedad de competidores que se encontraban en tierra firme; de la misma manera los posibles competidores terrestres no representaban problema para los cocodrilos perfectamente adaptados al medio acuático. Se sabe por los diferentes registros fósiles que la estructura básica de los cocodrilos apenas si se ha visto modificada con el paso de millones de años (Mader 2006).

Otras posibles causas de la pobre variabilidad genética en cocodrilos pueden ser la deriva génica, debida a la gran presión por parte del ser humano que éste grupo de animales fue objeto a mediados del siglo XX principalmente. (Alvarez del Toro 1974).

Posibilidad de hibridación entre *C. acutus* y *C. moreletii*

La situación particular observada en la región de Chachahua en el Estado de Oaxaca, donde se observan cocodrilos con fenotipos “atípicos” se debe a la presencia de individuos con fenotipo de *C. moreletii*. Tales ejemplares se sabe fueron traídos al Parque Nacional de Lagunas de Chachahua en el Estado de Oaxaca en el año de 1976 provenientes del estado de Tabasco, con la intención de establecer un criadero en dicha región. El como llegaron a la vida libre permanece un tanto incierto (Com. pers. Verónica Peña Crisantos 2008).

En el caso de el estero en particular de lagunas de Chachahua se puede inferir que la hibridación va en ambos sentidos es decir, que machos *acutus* pudieran estar cubriendo hembras *moreletii* y viceversa, e incluso entre híbridos con individuos puros de ambas especies de cocodrilos.

En el trabajo de Ray y Densmore de 2004 se encontraron haplotipos de *acutus* en una población de *moreletii* y en la región que estudiaron se entiende el apareamiento de hembras *acutus* con machos *moreletii*

La hibridación se define como el apareamiento entre individuos de dos poblaciones genéticamente distinto, que produce descendencia.

Conociendo ésta situación durante el muestreo se decidió tomar muestras biológicas de aquellos individuos que llegaran a presentar rasgos morfológicos atípicos, capturándose cuatro ejemplares.

La introgresión es la incorporación de genes de una población a otra a través de la hibridación que resulta en descendencia fértil, que puede continuar apareándose con la población parental. (Allendorf 2007).

El hecho de observarse en los tres árboles agrupamientos de ejemplares de *C. acutus* con *C. moreletii*, puede pensarse que existe la posibilidad muy grande de que se esté presentando hibridación entre ambas especies de cocodrilos. A diferencia de lo reportado por Cedeño en 2008 en la Península de Yucatán y Ray en 2004 en Belice y Guatemala, donde ambas especies son simpátricas, en el Estado de Oaxaca el *C. moreletii* podría estar actuando como una especie invasora en el hábitat de *C. acutus*.

Las tasas de hibridación e introgresión se han incrementado dramáticamente en todo el mundo debido a traslocaciones accidentales intencionales de organismos en hábitats modificados por el ser humano. La hibridación ha contribuido a la extinción de muchas especies, a través de causas directas e indirectas. La severidad de éste problema ha sido subestimado por lo biólogos de la conservación (Rhymer y Simberloff 1996). El incremento de de las tres actividades humanas que contribuyen mayoritariamente a aumentar las tasas de hibridación (introducción de plantas y animales, fragmentación y modificación de hábitat), sugiere que éste problema será aún más serio en el futuro.

Por otro lado, la hibridación es también parte importante del proceso evolutivo, ya que juega un papel importante en la evolución de la plantas. Además estudios recientes han demostrado que el proceso de hibridación es de gran relevancia en la evolución de los animales (Arnold 1997).

Sin embargo la hibridación por causas antropogénicas, como puede ser el unir especies que de manera natural no comparten un determinado contexto espacio temporal, no es un proceso que pueda considerarse parte de la evolución natural de las especies. La hibridación antropogénica puede ser intencional, como es el caso de las explotaciones comerciales, o puede ser resultado de la introducción de especies exóticas, fragmentación y destrucción de hábitats.

La hibridación no intencional es frecuentemente un problema de interés de la biología de la conservación, ya que si ocurre, puede no ser detectada de manera oportuna, particularmente si los híbridos no presentan características físicas que permitan identificarlos (Fitzsimmons *et al.* 2002).

La detección de hibridación puede ser difícil, aunque en las últimas dos décadas se ha facilitado con la ayuda de diferentes técnicas moleculares (Stone 2000).

La hibridación entre *C. moreletii* y *C. acutus* ha sido postulado desde hace tiempo (Ross y Ross 1974; Ross y Mayer 1983). Típicamente los ejemplares de *C. moreletii* presentan de cinco a seis escamas en cada fila transversal de escamas dorsales y exhiben grupos de escamas irregulares en las superficies ventral y lateral de la cola (Brazaitis 1973; Ross y Ross 1974; Ross y Mayer 1983) mientras que los especímenes de *C. acutus* presentan un número menor de escamas en cada fila dorsal y grupos de escamas regulares en la cola. Figuras 13 y 14. Se ha reportado la presencia de cocodrilos con características de ambas especies en las regiones costeras de México (Powell 1972) y Belice (Platt y Thorbjarnarson 1997; Sigler 1998). Así como ejemplares de la especie *C. moreletii*. Figura 15.

Análisis preliminares con microsatélites, realizados en regiones donde existe simpatria para *moreletii* y *acutus* sugieren la posibilidad de hibridación entre ambas especies (Ray 2004).

Las poblaciones de cocodrilos que sean identificadas como puras de una u otra especie, deben recibir esfuerzos de conservación importantes para protegerlas.

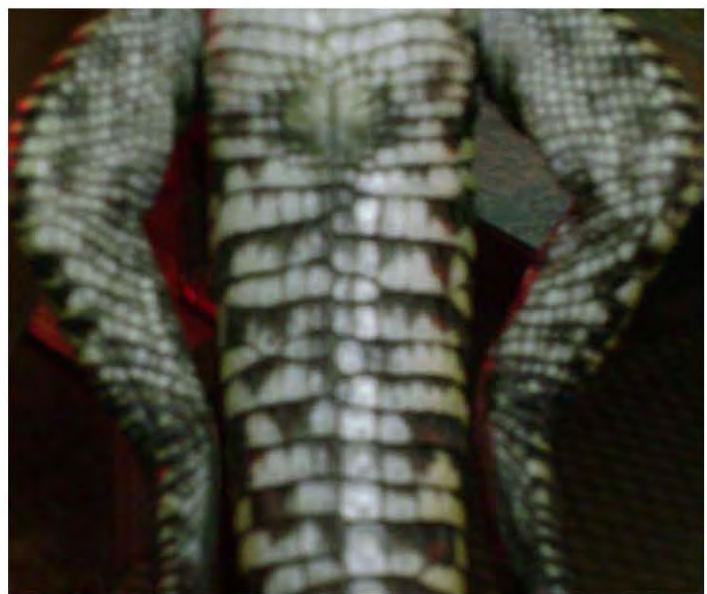
Por lo anterior sería conveniente el inicio de más investigaciones en el Área Natural Protegida de Lagunas de Chacahua para conocer el estatus poblacional de *C. acutus* y además identificar como se está comportando la población de *C. moreletii* e híbridos de ambas especies. Es importante conocer como se llevan a cabo los patrones de reproducción en las diferentes épocas de apareamiento y cuáles son las preferencias de hábitat de los tres grupos.

El empleo de herramientas de genética molecular permitiría la adecuada discriminación de especies y asimismo llevar a cabo el retiro del área de animales que no se compruebe su identidad como *C. acutus*. Se hace necesario el uso de marcadores moleculares nucleares como los microsatélites para evidenciar el sentido

de la hibridación es decir que permita conocer el origen de la especie de los padres (machos). Para conocer como es el comportamiento reproductivo y determinar si en la región de Lagunas de Chacahua el *C. moreletii* pudiera actuar como especie invasora y desplazar a la especie nativa.

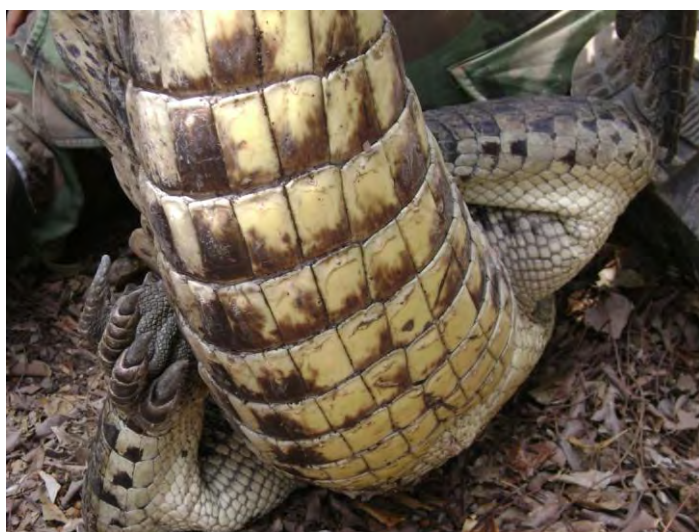


A

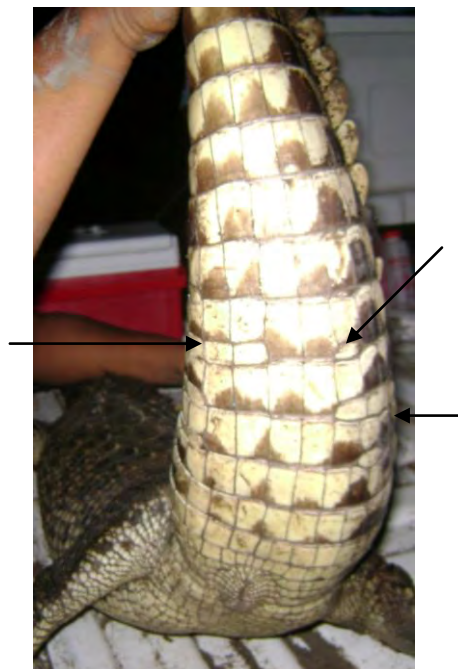


B

Figura.13 A Ejemplar juvenil de *C. acutus* donde se observa el patrón de escamas caudales ventrales característico de la especie. **Figura 13 B.** Ejemplar juvenil de *C. moreletii* donde se observa el patrón de escamas caudales ventrales característico de la especie



A



B

Figura 14A. Ejemplar adulto de *C. acutus* que muestra el patrón de escamas caudales ventrales característico de la especie, en comparación con la **Figura 14B** donde puede apreciarse un patrón de líneas de escamas discontinua. Tal ejemplar presentó haplotipo de *C. moreletii*



Figura 15. Ejemplar hembra de *C. moreletii*, capturado en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca México.

LITERATURA CITADA

1. Álvarez del Toro M. 1974. Los Crocodylia de México, Estudio Comparativo. Ediciones del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C. México D.F.
2. Allendorf FW, Lundquist LL. 2003. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology* 17: 24-30.
3. Arnold ML. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, New York.
4. Avise JC. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Chapman & Hall, New York.
5. Awadalla PA, Eyrewalker A, Smith JM. 1999 Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 286:2524-2525.
6. Brazaitis P. 1973. The identification of living crocodylians. *Zoologica* 58:59-88
7. Casas-Andreu G, Reyna-Trujillo T, Méndez de la Cruz FR. 1990 Estado actual de *Crocodylus acutus* en la Costa del Pacífico de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 41:57-62.
8. Cedeño Vázquez JR. 2008. Genética de poblaciones, flujo genético e hibridación de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en la Península de Yucatán, México. Tesis Doctoral. El Colegio de la Frontera Sur.
9. Chung Fai Yau F, Wong KL, Wang J, But PPH, Shaw PC. 2002. Generation of a sequenced characterized amplified region probe for authentication of crocodylian species. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 294:382-386
10. CITES. Propuesta para transferir a la población mexicana del *Crocodylus moreletii* del Apéndice I al II de CITES. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre. Vigésimo tercera reunión del Comité de Fauna Ginebra Suiza, 19-24 de abril 2008.
11. Dessauer HC, Glenn T, Densmore LD. 2002. Studies on the Molecular Evolution of the Crocodylia: Footprints in the Sands of Time. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 294:302-311.
12. Densmore LD, White PS. 1991. The systematics and evolution of the Crocodylia as suggested by restriction endonucleasas analysis of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA. *Copeia* 3:602-615.

13. Dever JA, Strauss RE, Rainwater TR, McMurry ST, Desmore LD. 2002. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* 4:1078-1091.
14. Eisner T, Lubchenco E, Wilson O, Wilcove DS, Bean MJ. 1995. Building scientifically sound policy for protecting endangered species. *Science* 268:1231-1233.
15. FitzSimmons NN, Buchan JC, Lam PV, Polet G, Hung TT, Thang NQ, Gratten J. 2002 Identification of pure breed *Crocodylus siamensis* for reintroduction in Vietnam. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 294:373-381.
16. Flint NS, Van de Bank FH, Grobler. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA* 1:105-110.
17. 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* 23:53-71
18. Gartside, DF, Dessauer HC, Joanen. 1977. Genetic homozygosity in an ancient reptile *Alligator mississippiensis*. *Biochem. Genet.* 8:655-664.
19. Glenn TC, Stephan W, Braun MJ 1998. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. *Copeia* 1998:591-601.
20. Glenn TC, Staton JL, Vu AT, Davis LM, Alvarado Bremer JR, Rhodes WE, Brisbin IL, Sawyer RH. 2002. Low Mitochondrial DNA Variation Among American Alligators and a Novel Non-Coding region in Crocodylians. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 294:312-324.
21. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. 1996. *An Introduction to Genetic Analysis*. Sixth Edition. W. H. Freeman And Company. New York USA.
22. Guevara LM. 2008. Patrones filogeográficos de *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) en México, basados en el gen citocromo b y la región control. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
23. Gyllensten, U., D. Wharton, A. Josefsson, A. C. Wilson. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352:255-257.
24. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. *Nucl. Acids. Symps. Ser.* 41:95:98

25. Hartl DL, Jones EW. 2001. Genetics. Analysis of Gene and Genomes. Fifth Edition. Jones and Barlett Publishers. Mississauga, Canada.
26. Huelsenbeck, JP. 2000. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Distributed by the author. Department of Biology. University of Rochester.
27. Isberg SR, Chen Y, Barker SG, Moran C. 2004. Analysis of microsatellites and parentage testing in saltwater crocodiles. *Journal of Heredity* 95:445-449.
28. Janke A, Arnason U. 1997. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent Archosauria (birds and crocodiles). *Mol Biol Evol* 14:1266-1272.
29. Kasapidis PF, Suchentrunk A, Magoulas, Kotoulas G. 2005. The shaping of mitochondrial phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Mol. Phylogenetics Evol.* 34:55-56.
30. Kumar, SK, Tamura, I, Jakobsen y M, Nei. 2001. Mega: Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Versión 2.1. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 (www.megasoftware.net).
31. Kushlan J, Mazzotti FJ. 1989. Population biology of American crocodile. *Journal of Herpetology* 23:7-21.
32. Lawson R, Kofron CP, Dessauer HC. 1989. Allozyme variation in a natural population of the Nile crocodile. *Am. Zool.* 29:863-871.
33. McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier, Werner TB. 1990. Conserving the world's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US, and the World Bank, Washington DC.
34. Mader DR. 2006. Reptile Medicine and Surgery. Second Edition. Saunders/Elsevier. St. Louis Missouri USA.
35. Magnuson WE. 1982 Techniques of surveying for crocodiles. Pp. 389-403. in: Proceedings 5th Working Meeting of Crocodile Specialist Group, IUCN. Morges, Switzerland.

36. Miller HC, Lambert DM. 2003. An Evaluation of Methods of Blood Preservation for RT-PCR from Endangered Species. *Conservation Genetics* 4:651-654.
37. Mau B, Newton M y Larget B. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* 55: 1-12.
38. Myers N, Koll AH. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 89:5389-5392.
39. Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
40. Diario Oficial de la Federación. Segunda sección, 6 de marzo de 2002.
NOM-059-SEMARNAT-2001
41. O'Brien SJ. A role for molecular genetics in biological conservation. 1994. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 91: 5748-5755
42. Pérez, DP. 2002 Estado de conservación de la vegetación del parque Nacional Lagunas de Chacahua: propuesta para su rehabilitación. En Alfaro M. y Sánchez G. (coordinadores). Chacahua: reflejos de un parque. CONAMP-PNUD-SEMARNAT-PNLCh.
43. Pimm, SL y otros 31. 2001 Environment- can we defy nature's end? *Science* 293:2207-2208.
44. Platt SG, Thorbjarnarson JB. 2000b. Population status and conservation of Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*, in northern Belize. *Biol. Cons.* 96:21-29.
45. Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution: *Bioinformatics* 9: 817-818.
46. Posada D y KA Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45.
47. Pough FH, Andrews RM, Cadle JE y Crump ML. 2003. *Herpetology*. Tercera Edición. Prentice Hall. EUA.
48. Powell J. 1972. The Morelet's crocodile: An unknown quantity. *Animal Kingdom* 2:21-26.
49. Ray DA, White PS, Cullen T, Densmore LD. 2000. High levels of genetic variability in West African Crocodiles *Osteolaemus tetraspis tetraspis*. *Crocodylian Biology and Evolution*. 58-63

50. Ray DA; Densmore LD. The Crocodilian Mitochondrial Control Region: General Structure, Conserved Sequences, and Evolutionary Implications. 2002. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 294:334-345.
51. Ray DA; Densmore LD. 2003. Repetitive Sequences in the Crocodilian Mitochondrial Control Region: Poly-A Sequences and Heteroplasmic Tandem Repeats. *Mol. Biol. Evol* 20:1006-1013
52. Ray DA, Dever JA, Platt SG, Rainwater TR, Finger AG, McMurry ST, Batzer MA, Barr B, Stafford PJ, McKnigh J, Densmore LD. 2004. Low Levels of Nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conservation Genetics* 5:449-462.
53. Rhymer JM, Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:83-109.
54. Ross J, Janke A. 2008. The importance of data sampling in resolving crocodilian relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10.1016/j.ympev.2008.05.018.
55. Ross FD, Mayer GC. 1983 On the dorsal armour of the Crocodilia. In: *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology* (eds. Rhodin AGJ, Miyata K) pp. 305-331. Museum Comp Zool., Cambridge.
56. Ross CA, Ross FD. 1974. Caudal escalation of Central American *Crocodylus*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 87:231-234.
57. Sánchez Vilchis M. 2007 Análisis de la variación genética de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
58. Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125-140.
59. SEMARNAP, 1997. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Crocodylia en México (CROMACROM)
60. Sigler L. 1998 A *Crocodylus acutus* with the appearance of a *C. moreletii*. *Crocodile Specialist Group Newsletter* 73:9-11.
61. Strimmer K y Vonhaeseler A. 1996. Quartet puzzling: A quartet Maximum-Likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13: 964-969.
62. Sutherland BD, Stewart ER, Kenchington E, Zouros. 1998. The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* 148:341-347.

63. Stone G. 2000. Phylogeography, hybridization and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 15:354-355.
64. Thorbjarnarson J. 1988 The status and ecology of the American crocodile in Haiti. *Bulletin Florida state Museum of Biological Science* 33:1-86.
65. IUCN 2001. IUCN Red List Categories and Criteria: version 3.1 IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK.
66. Webb GJ, Anderson DR, Messel WH. 1977. Crocodile Capture techniques. *Journal of Wildlife Management* 41: 572:575.
67. Woodruff DS. 2001. Declines of biomes and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98:5471-5476.
68. Yan P, Wu XB, Shi Y, Gu CM, Wang RP, Wang CL. 2005. Identification of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biological Conservation* 121:45-51.
69. Yang Z, y Rannala B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Harkov Caín Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14: 717:724.
70. Zardoya R, Meyer A. 1998. Complete Mitochondrial Genome suggests Diapsid Affinities of Turtles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 14:226-231.
71. Zug G, Vitt L y Caldwell J. 2001. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibinas and Reptiles*. Segunda Edición. Academic Press. EUA.
72. www.cites.org
73. www.semarnat.gob.mx

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del cocodrilo de río <i>Crocodylus acutus</i>	4
Figura 2. Morfología del cocodrilo de pantano <i>Crocodylus moreletii</i>	3
Figura 3. Genoma mitocondrial de humano	7
Figura 4. Representación esquemática de la región control de los cocodrilos	9
Figura 5. Localidades de muestreo en la Costa del Estado de Oaxaca	19
Figura 6. Amplificación de productos de PCR	23
Figura 7. Purificación de productos de PCR	24
Figura 8. Alineamiento de las secuencias analizadas	27
Figura 9. Árbol generado mediante Neighbor-Joining	30
Figura 10. Cladograma generado mediante Quartet Puzzling	31
Figura 11. Análisis Bayesiano. Cladograma consenso	32
Figura 12. Red de haplotipos	33
Figura 13A y 13B. Patrones de escams caudales en cocodrilos	44
Figura 14A y 14B. Patrones de escams caudales en cocodrilos	44
Figura 15. Ejemplar hembra de <i>C. moreletii</i>	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Localidades de Muestreo en la región costera del Estado de Oaxaca	19
Cuadro 2. Muestreo por localidad	21
Cuadro 3. Distribución de haplotipos de las tres localidades estudiadas	28
Cuadro 4 Distribución de haplotipos sin considerar los del tipo de <i>C. moreletii</i> , únicamente los del tipo de <i>C. acutus</i> .	34
Cuadro 5. Haplotipos del tipo <i>moreletii</i>	35
Cuadro 6. Haplotipos no publicados previamente	35
Cuadro 7. Comparación de índices de diversidades nucleotídica y haplotípica en trabajos realizados con diferentes especies de cocodrilos	37
Cuadro 8. Comparación de la diversidad nucleotídica del ADNmt del aligador americano con fragmentos conteniendo el Dominio I de la región control de otras especies.	39