



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Estructura genética poblacional e Hibridación de *Crocodylus acutus* y
Crocodylus moreletii y sus implicaciones en la conservación**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA**

Aliet Rojas Santoyo

Tutor: Dr. Raúl Ulloa Arvizu

**Comité Tutorial: Dr. Carlos Vásquez Peláez
Dr. Gustavo Casas Andreu**



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.

**Estructura genética poblacional e Hibridación de *Crocodylus acutus* y
Crocodylus moreletii y sus implicaciones en la conservación**

Reconocimientos

El Presente trabajo fue realizado gracias a la Beca para Estudios de Maestría otorgada por CONACYT, Número de Registro: CVU Becario 264646.

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Raúl Ulloa Arvizu en el Depto. de Genética y Bioestadística y en el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Por su evaluación y guía para la realización del presente trabajo, se reconoce a los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Raúl Ulloa Arvizu
Dr. Carlos Vásquez Peláez
Dr. Gustavo Casas Andreu

Por su evaluación, sugerencias y aprobación a este trabajo se reconoce al Jurado compuesto por:

Dr. Raúl Ulloa Arvizu
Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales
Dr. Carlos González Rebeles-Islas
Dr. Oscar Alberto Flores Villela
Dra. Gabriela Parra Olea

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Depto. de Genética y Bioestadística, por ser parte importante de mi formación personal y profesional.

Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu, por su apoyo, paciencia y guía constante para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Vásquez Peláez y al Dr. Gustavo Casas Andreu por su apoyo y su guía en mi formación académica y en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales a cargo del Laboratorio de Genética Molecular del Depto. de Genética y Bioestadística por el apoyo y las facilidades otorgadas para el desarrollo de mi investigación.

A Biol. Amanda Gayosso Vázquez por su guía constante, por su buena disposición y apoyo en el desarrollo de cada uno de los protocolos utilizados para la obtención de resultados.

A Juan Pablo Pintor Ríos por su apoyo y ayuda constantes en la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas (UMA CICEA) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por el apoyo otorgado para la toma de muestras sanguíneas de los ejemplares que se encuentran en sus instalaciones. Gracias Ezry, Eriane e Iliana Aguirre por su apoyo, tiempo y arduo trabajo. Una disculpa si la memoria me falla y no logro nombrar a todos, pero a cada uno de los miembros de la UMA CICEA, muchas gracias por su trabajo y su tiempo.

A Coco Maya, Cd. Del Carmen y a los dueños de dicha granja, - Ing. Marco Antonio Novelo Merino y Marco Antonio Novelo Rejón - por el apoyo y las facilidades otorgadas para la toma de muestras de los ejemplares que habitan en sus instalaciones.

A Biol. Tixel Vázquez Flores y Biol. Juan Carlos Cremiux por el apoyo incondicional, por su tiempo y por muchas horas de trabajo dedicadas a la obtención de muestras sanguíneas y de escamas para el presente trabajo. A sus ayudantes: Carmen Vázquez, Isidro Vázquez, Ismael Vázquez y Carlos Vázquez por su tiempo, su trabajo y su fuerza dedicada al apoyo de mi investigación.

Al Museo del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), a la Dra. Carmen Pozo de la Tijera y al curador Enrique Escobedo Cabrera, por las facilidades al donar muestras de ejemplares de las especies solicitadas para el presente trabajo.

A todos ustedes que formaron una parte muy importante en el desarrollo y obtención de este Título, Muchas Gracias.

Dedicatorias

De forma muy especial, dedico este trabajo a Alonso Carmona por tu apoyo y amor incondicional, por caminar a mi lado y por elegirme como tu compañera de vida. Este trabajo también es tuyo.

A mi padre por permanecer a mi lado en todo momento y por ser mi pilar incondicional.

A Zyanya, Canela, Pantera, Sansona, Biff, Filemón, Paloma†, Bebét, Cletot† y Chazz† por iluminar cada uno de días y arrancarme siempre una sonrisa.

Índice

	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción _____	3
1.2. Justificación _____	5
1.3. Objetivo _____	5
II. Antecedentes	
2.1. Historia de la conservación de los cocodrilos en México _____	6
2.2. Problemática actual _____	9
2.3. Distribución Mundial del Orden Crocodylia _____	10
2.4. Especies mexicanas de cocodrilos _____	11
2.5. Genética de la Conservación _____	16
2.6. Marcadores Moleculares _____	19
2.6.1. ADN Mitocondrial (ADNmt) _____	19
2.6.2. Gen de la Unidad I del Complejo Citocromo C Oxidasa (COI) _____	20
2.7. Diversidad Genética e Hibridación entre <i>Crocodylus acutus</i> y <i>C. moreletii</i> _____	21
III. Material y Método	
3.1. Área de Estudio _____	24
3.2. Genotipificación	
3.2.1. Purificación de ADN _____	27
3.2.2. Amplificación y Secuenciación del gen mitocondrial la Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI) _____	27
3.3. Análisis Genéticos _____	29
3.3.1. Diversidad Genética _____	29
3.3.2. Red Mínima de Haplotipos _____	30
3.3.3. Relaciones de similitud con un modelo de distancia _____	30
3.3.4. Estructura Poblacional _____	31

IV. Resultados	
4.1. Diversidad Genética del Gen COI en <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i> _____	32
4.2. Red Mínima de Haplotipos _____	38
4.3. Relaciones de similitud con un modelo de distancia _____	44
4.4. Estructura Genética _____	49
V. Discusión	58
5.1. Diversidad Genética _____	59
5.2. Relaciones de similitud _____	62
5.3. Estructura Genética _____	63
5.4. Hibridación _____	66
5.5. Implicaciones de la Hibridación en la conservación de especies _____	70
VI. Conclusiones _____	73
IX. Referencias _____	75
Anexo 1. Obtención de muestras sanguíneas del ceno venoso occipital y por medio del corte de quilla _____	83
Anexo 2. Protocolo de Purificación de DNA a partir de Sangre Kit DNeasy Blood & Tissue de QiaGen _____	84
Anexo 3. Purificación de Fragmentos de ADN con Yoduro de Sodio _____	86
Anexo 4. Precipitación de Fragmentos Amplificados por medio de Sephadex G50 _____	87

Lista de Cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Distribución de las especies de cocodrilos y caimán en Áreas Naturales Protegidas en México _____	8
Cuadro 2. Localidades de muestreo de <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i> _____	25
Cuadro 3. Patrones de sustitución nucleotídica estimados con Máxima Verosimilitud Compuesta _____	32
Cuadro 4. Sitios Polimórficos encontrados en las secuencias evaluadas en comparación con una secuencia de <i>C. acutus</i> tomada del GeneBank (GQ144571.1). _____	33
Cuadro 5. Sitios polimórficos que definen a cada haplotipo encontrado _____	34
Cuadro 6. Diversidad haplotípica y nucleotídica en las localidades de <i>C. acutus</i> . _____	36
Cuadro 7. Diversidad haplotípica y nucleotídica en las localidades de <i>C. moreletii</i> _____	36
Cuadro 8. Valores de los estadísticos de Neutralidad _____	37
Cuadro 9. Haplotipos encontrados en cada localidad muestreada _____	40
Cuadro 10. Distribución de Haplotipos _____	43
Cuadro 11. Distancias pareadas entre secuencias de seis especies de cocodrilos, calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) _____	49
Cuadro 12. Distancias Genéticas entre las secuencias agrupadas filogenéticamente (Gpo. 1 vs Gpo. 2) y entre las secuencias reconocidas morfológicamente como individuos <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i> _____	49
Cuadro 13. Distancias genéticas entre las localidades de <i>C. acutus</i> , calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas _____	50
Cuadro 14. Distancias genéticas entre las poblaciones de <i>C. moreletii</i> , calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas _____	51
Cuadro 15. Distancia dentro de las localidades de cada especie, calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas _____	52
Cuadro 16. Divergencia genética de localidades de <i>C. acutus</i> _____	53
Cuadro 17. Divergencia genética para las localidades de <i>C. moreletii</i> _____	54

Cuadro 18. Valores del índice de diferenciación F_{ST} para localidades de <i>C. acutus</i> _____	55
Cuadro 19. Valores de F_{ST} para localidades de <i>C. acutus</i> , descartando haplotipos atípicos ____	55
Cuadro 20. Valores de F_{ST} para localidades de <i>C. moreletii</i> _____	55
Cuadro 21. AMOVA en las localidades de <i>C. acutus</i> _____	57
Cuadro 22. AMOVA en las localidades de <i>C. moreletii</i> _____	57
Cuadro 23. AMOVA entre las localidades de <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i> _____	57
Cuadro 24. Valores de diversidad genética para <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i> generados por medio de ADNmt en otros estudios _____	60

Lista de Figuras

	Pág.
Fig. 1. Distribución actual de <i>C. acutus</i> en México (tomado de Casas y Aguilar, 2007) _____	13
Fig. 2. Distribución actual de <i>C. moreletii</i> en México (tomado de Casas y Aguilar, 2007) _____	15
Fig. 3. Ubicación de las localidades de muestro de individuos <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i> . _____	26
Fig. 4. Red mínima de haplotipos de los individuos identificados morfológicamente como <i>C. acutus</i> . Líneas oscuras, soportadas por un 99% de parsimonia y líneas delgadas, soportadas por el 90% de parsimonia. El tamaño de círculos corresponde a la frecuencia del haplotipo. _____	41
Fig. 5 Red mínima de haplotipos de los individuos identificados morfológicamente como <i>C. moreletii</i> . Líneas oscuras, soportadas por un 99% de parsimonia y líneas delgadas, soportadas por el 90% de parsimonia. El tamaño de círculos corresponde a la frecuencia del haplotipo. _____	41
Fig. 6. Red mínima de haplotipos. Muestra el número de haplotipos por especie. Líneas oscuras, soportadas por un 99% de parsimonia y líneas delgadas, soportadas por un 90% de parsimonia. _____	42
Fig. 7. Distribución de los Haplotipos en las localidades de muestreo de ambas especies. Ca: Individuo identificado morfológicamente como <i>C. acutus</i> ; Cm: individuo identificado como <i>C. moreletii</i> . _____	43
Fig. 8. Árbol construido con Neighbor Joining, con un Modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta (Transiciones + Transversiones. Los números muestran los valores de bootstrap. _____	45
Fig. 9. Árbol construido con Neighbor Joining con un Modelo de Nei-Gojobori (Distancia con sustituciones sinónimas). Los números muestran los valores de bootstrap. _____	46
Fig. 10. Árbol construido con Neighbor Joining con un Modelo de Nei-Gojobori (Distancia con sustituciones no sinónimas). Los números muestran los valores de bootstrap. _____	47
Fig. 11. Zonas registradas con individuos híbridos. Los triángulos negros corresponden a individuos fenotípicamente <i>C. acutus</i> con haplotipos propios de <i>C. moreletii</i> . Los círculos rojos corresponden a individuos fenotípicamente <i>C. moreletii</i> pero con haplotipos de <i>C. acutus</i> . El Cuadro azul corresponde al haplotipo <i>C. rhombifer</i> encontrado en un individuo fenotípicamente <i>C. acutus</i> (Cedeño-Vázquez et al., 2008). La zona de Quintana Roo corresponde a los resultados obtenidos por Cedeño-Vázquez et al. (2008) y por el presente trabajo. La zona de Belice corresponde a los resultados obtenidos por Ray et al. (2004). La zona de Tabasco (Buenavista) corresponde a resultados obtenidos en el presente trabajo; y la zona de Oaxaca (Chacahua) corresponde a los resultados de Serrano-Gómez (2010) y al presente trabajo. Nota: Mapa modificado del que presenta Cedeño-Vázquez et al. (2008). Debido a la escala del mapa no es posible corresponder cada punto, pero sí un área determinada. _____	68

Resumen

Debido al manejo que se realizó en el pasado en poblaciones de cocodrilos mexicanos en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán; es que surge el interés por su estado de conservación. Por medio de estudios genéticos de dichas poblaciones se ha aportado información para el manejo sustentable de estas especies.

Se evaluó la diversidad y estructura genética de las especies *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii*, en localidades en donde se distribuyen naturalmente y en granjas comercializadoras; esto por medio del gen mitocondrial codificante para la Citocromo Oxidasa subunidad I (Gen COI).

Se obtuvieron secuencias de 641 pb. de cada individuo analizado y se compararon con secuencias tomadas del GeneBank. El alineamiento de todas las secuencias y el análisis de sitios polimórficos mostró la existencia de individuos identificados fenotípicamente como *C. acutus* o *C. moreletii*, pero con haplotipos de la especie contraria. Debido a esto, todos los análisis se realizaron descartando haplotipos atípicos en cada especie.

Los valores de diversidad genética fueron bajos; para *C. acutus* ($h = 0.455 \pm 0.123$; $\pi = 0.0009 \pm 0.0002$) y para *C. moreletii* ($h = 0.505 \pm 0.158$; $\pi = 0.0009 \pm 0.0003$). Los estadísticos de diferenciación (distancias genéticas, divergencia genética y F_{ST}) mostraron poca estructura entre las localidades muestreadas, y el AMOVA mostró que el mayor porcentaje de la variación se encuentra distribuida dentro de cada localidad y que estas no se encuentran estructuradas.

Se obtuvieron agrupamientos de individuos identificados como *C. acutus* con haplotipos propios de *C. moreletii*; e individuos identificados fenotípicamente como *C. moreletii* con haplotipos propios de *C. acutus*. Esto nos indica que existe hibridación en ciertas localidades muestreadas.

La hibridación encontrada en Lagunas de Chacahua, Oaxaca; coincide con lo reportado anteriormente, por lo que puede ser considerada como una zona de hibridación debido a la introducción de individuos *C. moreletii*. Los individuos híbridos encontrados en diferentes localidades de Quintana Roo corresponden a las zonas de hibridación reportadas por Cedeño-Vázquez *et al.* (2008). Los individuos híbridos provenientes de Buenavista, Tabasco; por ser hembras reproductoras de la granja Coco Maya (Cd. del Carmen, Campeche) nos indica que existe viabilidad reproductiva en los individuos híbridos interespecíficos.

Los programas de manejo deben tomar en cuenta los procesos de hibridación que están ocurriendo tanto en poblaciones naturales como en las que se encuentran en cautiverio, ya que las consecuencias del aporte de individuos híbridos a poblaciones naturales aún no se conocen con certeza, por lo tanto; los planes de manejo y conservación de estas especies deben de priorizar la identificación genética de individuos destinados a la reproducción, reintroducción y recuperación de las poblaciones naturales.

Palabras Clave: Conservación, *Crocodylus acutus*, *Crocodylus moreletii*, Gen mitocondrial (COI), diversidad genética, estructura genética, haplotipos, hibridación.

Abstract

Due to handling made in the past in populations of Mexican crocodylians in the states of Campeche Colima, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán arise the interest for its state of conservation.

In that sense genetic studies have contributed to the knowledge about the sustainable management of these species.

The genetic diversity and structure of *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* were evaluated in localities where such species live naturally and in marketing farms through the mitochondrial gene codifying for Cytochrome Oxidase Subunit I (COI).

Sequences of 641 pb were obtained to every analyzed individual and they were compared with sequences taken from GeneBank. The alignment of all sequences and the analysis of polymorphic sites shown the existence of individuals phenotypically identified like *C. acutus* or *C. moreletii* but with haplotypes from the opposite species. Due to this, the analysis were made discarding the atypical haplotypes on every species.

The genetic diversity values were low for *C. acutus* ($h = 0.455 \pm 0.123$; $\pi = 0.0009 \pm 0.0002$) and *C. moreletii* ($h = 0.505 \pm 0.158$; $\pi = 0.0009 \pm 0.0003$). The differentiation statistics (genetics distances, genetic divergence and F_{ST}) showed a low structure between localities sampled and the AMOVA showed that the higher percentage of the variation is distributed within each locality and that they are not structured.

Both, groups of individuals identified as *C. acutus* with *C. moreletii* haplotypes like, and group of individuals phenotypically identified as *C. moreletii* with *C. acutus* haplotypes were obtained; indicating that hybridization exists in some locations sampled.

Hybridization found in Lagunas de Chacahua, Oaxaca, match to what was found on previous reports, and by that it can be considered as a hybridization zone due to translocation of *C. moreletii* individuals. Hybrids found in different localities in Quintana Roo correspond to the hybridization zones reported by Cedeño-Vazquez *et al.* (2008). Since hybrids individuals coming from Buena vista, Tabasco are reproductive females from Coco Maya farm (Cd. Del Carmen, Campeche), this indicated to us that there is reproductive viability on the interspecific hybrids individuals.

Management programs must take in account that hybridization programs occurring in both; natural populations and those in captivity since the consequences of hybrid individual contribution to natural population has not been well established so far, therefore, management programs and conservation of these species should prioritize the genetic identification of individual destined to reproduction, reintroduction and natural populations recovery.

Keywords: conservation, *Crocodylus acutus*, *Crocodylus moreletii*, Mitochondrial gen (COI), genetic diversity, haplotypes, hybridization.

I. Introducción

En la historia reciente de México, las especies de cocodrilos distribuidas en el país han sido aprovechadas económicamente de una manera poco sustentable; durante el siglo pasado estas fueron objeto de caza intensiva con el fin de comercializar su piel y su carne, debido a la alta demanda en el comercio nacional e internacional de dichos productos (Casas-Andreu 1995, Ross 1998, COMACROM 2000). Esta práctica también obedecía al temor que experimentaban los habitantes de regiones aledañas al hábitat de dichas especies al ver amenazadas su seguridad y la de su ganado por dichos animales (Álvarez del Toro 1974, Casas-Andreu 1995).

La caza indiscriminada de las dos especies de cocodrilos mexicanos - *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* – y la del *Caiman crocodilus fuscus* resultó en una drástica disminución de sus poblaciones llevándolas al riesgo de desaparecer (Álvarez del Toro 1974, Ross 1998, Álvarez del Toro y Sigler 2001).

Debido a la grave situación en la que se encontraban dichas especies, en 1970 el Gobierno Federal Mexicano declaró veda total y permanente a la caza de las tres especies antes mencionadas (Casas-Andreu 1995). Sin embargo, esta decisión trajo otros problemas a resolver; pues la caza ilegal siguió ocurriendo, aunque de manera no tan intensiva; y los habitantes de las cercanías que en el pasado obtenían ingresos de la venta de pieles de cocodrilos comenzaron a aprovechar otras especies que habitan en los mismos ecosistemas (Casas-Andreu 1995). Aunado a esto, se comenzaron a transformar los ecosistemas y los hábitats de los cocodrilos comenzaron a verse fragmentados, contaminados y seriamente disminuidos (Casas-Andreu 1995, Ross 1998, COMACROM 2000, Casas y Aguilar 2007).

Durante la década de los 80's se implementaron programas de aprovechamiento sustentable, con el fin de aportar ingresos económicos a las comunidades aledañas, pero bajo un esquema de reproducción y cría en cautiverio fomentando la conservación de poblaciones silvestres (Casas-Andreu 1995, COMACROM 2000). Sin embargo, sólo la especie *C. moreletii* ha sido la más favorecida por los programas de cría intensiva, debido a la demanda comercial de su piel; mientras que las especies *C. acutus* y *Caiman crocodilus fuscus* han sido relegadas de dichos programas de conservación (Álvarez del Toro y Sigler 2001, COMACROM 2000).

Dada la situación de las poblaciones de cocodrilos, el Grupo de Especialistas en Cocodrilos (CSG), perteneciente a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha priorizado la necesidad de generar estudios que aporten información básica de tipo genético, filogenético, de

estructura poblacional y de patrones de migración (Ross 1998); así como de poder dar recomendaciones para la toma de decisiones y mejorar los programas de aprovechamiento sustentable y de conservación (Álvarez del Toro y Sigler 2001, Casas-Andreu 2003, Ray *et al.* 2004, Sánchez-Vilchis 2007).

Debido a la necesidad de generar información de tipo genético de las poblaciones de cocodrilos se han usado marcadores moleculares como herramientas para entender el efecto de la disminución de los tamaños poblacionales sobre diversos factores genéticos poblacionales y su relación con el ambiente, este tipo de estudios son abordados por la genética de la conservación (Hedrick y Miller 1992). Por ejemplo, se sabe que la disminución y la fragmentación poblacional repercute en el tamaño efectivo de la población y por lo tanto en la pérdida de diversidad genética y en la habilidad que tienen los individuos a evolucionar a cambios ambientales (Rocha y Gasca 2007). Los análisis genéticos permiten estudiar, además de la diversidad genética; la fragmentación poblacional, la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas y el efecto de la acumulación o la pérdida de mutaciones deletéreas (Rocha y Gasca 2007), así como el efecto que tienen las cruzas consanguíneas dentro de una población (Amos y Balmford 2001).

A la fecha se han realizado diversos estudios genéticos (Dever *et al.* 2002, Ponce-Campos y Dubach 2004, Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Sánchez-Vilchis 2007, Cedeño *et al.* 2008, Machkour *et al.* 2009, Serrano-Gómez 2010) que han evidenciado baja diversidad genética en las poblaciones de *C. acutus* y *C. moreletii*, y se ha planteado que un modelo de aislamiento por distancia impera en las poblaciones del país (Dever *et al.* 2002, Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Sánchez-Vilchis 2007, Cedeño *et al.* 2008); ésto es, que los individuos de una población sólo migran a poblaciones contiguas más cercanas.

Por otro lado, se han evidenciado zonas de hibridación bidireccional en la zona de simpatria entre *C. acutus* y *C. moreletii* en la Península de Yucatán (Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Cedeño *et al.* 2008), así como zonas de hibridación en áreas de distribución original de *C. acutus*, encontrando individuos con caracteres *C. acutus* pero con haplotipos mitocondriales de *C. moreletii* (Serrano-Gómez 2010).

Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la diversidad genética, la estructuración poblacional y la posible hibridación en zonas de distribución original y en ejemplares en cautiverio de *C. acutus* y *C. moreletii*; a través del Gen de la Citocromo C Oxidasa, subunidad I (COI).

1.2. Justificación

Debido a la importancia en diferentes aspectos sociales y biológicos, la conservación de las especies de cocodrilos mexicanos y su hábitat es prioritaria. Con estudios de genética poblacional se puede conocer la diversidad y la estructura genética de especies con importancia económica y con ello aportar información para dirigir de una manera más eficiente los programas de conservación, manejo y aprovechamiento sustentable; en este caso de las dos especies mexicanas de cocodrilos, *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii*.

1.3. Objetivo

Conocer la diversidad genética y los niveles de estructuración poblacional de *Crocodylus acutus* (cocodrilo americano o de río) en cuatro localidades del Pacífico mexicano y de Quintana Roo; así como de *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) en cuatro localidades del Golfo de México y tres de Quintana Roo; utilizando el gen mitocondrial de la Subunidad I (gen COI).

Objetivos particulares

- Obtener la secuencia nucleotídica de un segmento del gen mitocondrial COI de las muestras de tejido de los ejemplares recolectados de *C. acutus* y *C. moreletii*.
- Evaluar la diversidad y la estructura genética dentro y entre las localidades muestreadas para *C. acutus*.
- Evaluar la diversidad y la estructura genética dentro y entre las localidades muestreadas para *C. moreletii*.
- Evaluar si existe hibridación en las localidades muestreadas de ambas especies.

II. Antecedentes

2.1. Historia de la conservación de los cocodrilos en México

El aprovechamiento de las especies de cocodrilos mexicanos había sido de manera desmedida; se sabe que su comercio internacional comenzó durante la década de 1870, y se tienen registros de la explotación de poblaciones naturales de 1937 a 1967 (Casas-Andreu 1995); entonces, México era considerado como el principal exportador de pieles de cocodrilo a los Estados Unidos (Casas-Andreu 1995, Ross 1998, COMACROM 2000, Rodríguez 2007). A principios de 1970 el Gobierno Federal Mexicano declaró en veda total y permanente a las dos especies de cocodrilos y una especie de caimán (*Crocodylus acutus*, *C. moreletii* y *Caiman crocodilus fuscus*). Y aunque a principios de esa década, el Gobierno Federal ya operaba criaderos con la finalidad de conservar las especies y repoblar áreas protegidas no fue sino hasta mediados de los años 80 que la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) promovió el establecimiento de criaderos intensivos de cocodrilo con fines comerciales (Casas-Andreu 1995, COMACROM 2000).

En la actualidad, el aprovechamiento y conservación de fauna silvestre están reguladas a nivel nacional por la Ley General del Equilibrio Ecológico y de Protección al Ambiente (LGEEPA) y la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994; y a nivel internacional el comercio se rige por los reglamentos de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES por sus siglas en inglés). A finales de la década de los 80's en México se implementa el Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SINAP) sustentada legalmente en la LGEEPA (1988 - 1996) (INE 1995, COMACROM 2000). A la fecha existen 27 áreas naturales protegidas declaradas (ANP's) o propuestas bajo varias categorías de protección y son operadas por los gobiernos federal, estatal o municipal. En cada una de estas ANP's se distribuyen al menos una de las dos especies mexicanas de cocodrilos o de caimán y estas se enlistan en el cuadro 1 (INE 1995, COMACROM 2000).

Durante el periodo de 1997 a 2000 surge el Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Crocodylia en México (COMACROM), con el objetivo de fomentar la conservación y aprovechamiento sustentable de las especies de cocodrilos a través de las UMAs (Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre) (Casas-Andreu 2010). Gracias a este proyecto, en México se han establecido criaderos o granjas de cocodrilos con el fin de ser comercializados bajo los estatus de las leyes que rigen el comercio de fauna silvestre a nivel mundial (CITES). Sin embargo, la especie que se ha visto más favorecida por el manejo sustentable y su reproducción en cautiverio ha sido *Crocodylus moreletii*, debido principalmente a que su piel es más apreciada en la industria peletera, pues se distingue por su escama chica, su tersura y lo

atractivo y regular de su dibujo (Alvarez del Toro y Sigler 2001). A nivel mundial la piel de *C. moreletii* ocupa el segundo lugar en comercialización y en primer lugar se encuentra la piel de *C. porosus* (COMACROM 2000).

Se cree que a últimas fechas las poblaciones de cocodrilos se han podido recuperar; debido a las nuevas fuentes de empleo generadas para las poblaciones humanas que se encuentran cerca del hábitat de los cocodrilos. Estas nuevas fuentes de empleo que se han generado provienen de la industria pecuaria y turística; además de la comercialización de individuos provenientes de granjas y de la comercialización de pieles de otras especies de reptiles (Casas y Aguilar 2007).

Cuadro 1. Distribución de las especies de cocodrilos y caimán en Áreas Naturales Protegidas en México

Nombre	Estado	Superficie (Ha.)	Categoría *	Especie **
1. Laguna de Términos	Campeche	719, 518	A.P.F.F	<i>C.m.</i>
2. Los Petenes	Campeche	1, 300, 000	R.E.B.	<i>C.m</i>
3. Calakmul	Campeche	723, 185	R.B.	<i>C.m</i>
4. Montes Azules	Chiapas	331, 200	R.B.	<i>C.m. C.a</i>
5. Lacan-Tum	Chiapas	61, 873	R.B.	<i>C.m, C.a.</i>
6. La Encrucijada	Chiapas	144, 000	R.E.B.	<i>C.a. C.c.f.</i>
7. El Ocote	Chiapas	48, 140	R.E.B.	<i>C.m.</i>
8. Chan-Kin	Chiapas	12, 184	R.E.B.	<i>C.m.</i>
9. Cañón del Sumidero	Chiapas	21, 789	P.N.	<i>C.a</i>
10. Chamela-Cuixmala	Jalisco	13,142	R.B.	<i>C.a.</i>
11. Marismas Nacionales	Nayarit	92, 000	R.B.	<i>C.a.</i>
12. San Blas	Nayarit	2, 500	A.P.R.N	<i>C.a.</i>
13. Lagunas de Chacahua	Oaxaca	14, 187	P.N.	<i>C.a.</i>
14. Los Chimalapas	Oaxaca	800, 000	R.B.	<i>C.m, C.a.</i>
15. Sian Ka'an	Quintana Roo	528, 147	R.B.	<i>C.m, C.a.</i>
16. Yum Balam	Quintana Roo	152, 000	A.P.F.F.	<i>C.m.</i>
17. Banco Chinchorro	Quintana Roo	80,000	P.N.	<i>C.a.</i>
18. Uaymil	Quintana Roo	89,000	A.P.F.F.	<i>C.m., C.a.</i>
19. Isla Contoy	Quintana Roo	5,126	P.N.	<i>C.m., C.a.</i>
20. Pantanos de Centla	Tabasco	302, 706	R.B.	<i>C.m.</i>
21. Yumká	Tabasco	100	C.I.N.	<i>C.m.</i>
22. Laguna de Chaschoc	Tabasco	4, 202	R.E.	<i>C.m.</i>
23. Laguna Chiricahueto	Sinaloa	6, 000	R.E.	<i>C.a.</i>
24. Los Tuxtlas	Veracruz	155,122	R.B.	<i>C.m.</i>
25. La Mancha	Veracruz	25, 730	A.P.R.N	<i>C.m</i>
26. Ría Celestum	Yucatán	59, 130	R.E.B.	<i>C.m.</i>
27. Ría Lagartos	Yucatán	47, 480	R.E.B.	<i>C.m.</i>

* A.P.F.F.=Área de Protección de Flora y Fauna; R.B.=Reserva de la Biosfera; R.E.B.=Reserva Especial de la Biosfera; P.N.=Parque Nacional; E.B.=Estación Biológica; A.P.R.N.=Área de Protección de Recursos Naturales; C.I.M.=Centro de Interpretación de la Naturaleza; R.E.=Reserva Estatal. ** *C.m.* =*Crocodylus moreletii*, *C.a.*= *Crocodylus acutus*, *C.c.f.* =*Caiman crocodilus fuscus*.

(Fuente: COMACROM 2007)

2.2. Problemática actual

A nivel mundial, las poblaciones de cocodrilos han disminuido drásticamente, según la UICN de las 21 especies existentes 13 se encuentran en alguna categoría de riesgo. Las dos especies de *Crocodylus* que se distribuyen en nuestro país (*Crocodylus acutus* y *C. moreletii*) se encuentran catalogadas como “Sujetas a protección especial” (Pr); lo mismo ocurre con *Caiman crocodilus fuscus* (Casas y Aguilar 2007); esta última especie tiene una alta explotación (Álvarez del Toro y Sigler 2001, COMACROM 2000) y para la cual existen pocos estudios poblacionales.

La destrucción y fragmentación del hábitat han sido uno de los factores causales de la disminución de poblaciones de cocodrilos en nuestro país. Cada año las áreas de reproducción, refugio y alimentación como pantanos, ciénegas, ríos, estuarios y vegetación ribereña son transformadas, debido a que siguen siendo catalogadas erróneamente como tierras ociosas (Casas-Andreu 1995, Ross 1998, COMACROM 2000, Casas y Aguilar 2007). Los humedales, especialmente manglares que tienen gran importancia en la productividad biológica de los cocodrilos, han ido cediendo terreno a desmontes, rellenos para actividades agropecuarias, proyectos de camaronicultura o la simple desecación para disminuir la incidencia de plagas que se crían en este tipo de hábitats, además de haber sufrido alteraciones como resultado del desarrollo urbano o de la creación de infraestructura industrial y de servicios (Casas-Andreu 1995, Casas y Aguilar 2007); además de que la agricultura y ganadería han determinado las transformaciones ambientales más importantes en zonas rurales de México (SEMARNAP 1996).

La contaminación de los litorales con desechos agrícolas, industriales y domésticos es otro factor que afecta las poblaciones de cocodrilos en nuestro país. Se sabe que el 80% de la contaminación de sus hábitats proviene de aguas negras urbanas, residuos agrícolas e industriales y el 20% restantes proviene de actividades petroleras (Casas y Aguilar 2007, COMACROM 2000).

La alta demanda de pieles y productos derivados; la cacería y el comercio ilegal de individuos de talla comercial (tallas mayores a 1.5 metros de longitud) han menguado las poblaciones de cocodrilos, debido a la disminución de individuos reproductivos (Ross 1998, COMACROM 2000).

Otra problemática que ha afectado las poblaciones naturales de cocodrilos tiene que ver con la implementación de granjas comercializadoras de productos de *C. moreletii*. El manejo mal implementado de estas ha resultado en la introducción de individuos a zonas de distribución no originales; y en la reproducción de individuos de *C. moreletii* y *C. acutus*, originando individuos híbridos en las zonas de distribución original de *C. acutus*. Este es el caso del estudio que realizó Serrano-Gómez (2010) en localidades de Oaxaca, encontrando individuos *C. acutus* con caracteres anormales para dicha especie y al analizar la secuencia mitocondrial del D-loop o región control

observó haplotipos propios de *C. moreletii*; es decir individuos híbridos, que provienen de una línea materna *C. moreletii*.

Sin embargo, la hibridación entre estas dos especies ya ha sido reportada en zonas de distribución simpátrica (Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Cedeño *et al.* 2008, Rodríguez *et al.* 2008, Machkour *et al.* 2009); es decir que la reproducción entre estas especies ocurre de manera natural, aunque se cree que los sucesos de hibridación que se han documentado recientemente pudieron haber sucedido pocas generaciones atrás y que la actividad humana ha jugado un papel importante para que esta se lleve a cabo (Cedeño *et al.* 2008, Rodríguez *et al.* 2008, Machkour *et al.* 2009). A la fecha se sigue discutiendo acerca de cómo es que la hibridación entre estas dos especies podría afectar la diversidad genética de sus poblaciones y su estado de conservación.

2.3. Distribución Mundial del Orden Crocodylia

En la actualidad, se han clasificado tres familias de cocodrilianos en el mundo; *Crocodylidae* (cocodrilos) con 13 especies; *Alligatoridae* (caimanes) con 7 especies y la *Gavialidae* representada por una sola especie. Estas 21 especies vivientes, pertenecen a la clase Reptilia, subclase Archosauria y orden Crocodylia, se pueden localizar en las zonas tropicales y subtropicales de Australia, Nueva Zelanda, Tailandia, Nueva Guinea, China, India, África y América (COMACROM 2000, Alderton 2004).

2.4. Especies mexicanas de cocodrilos

El orden Crocodylia está representado en México por tres especies; *Crocodylus acutus* (cocodrilo de río), *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) y *Caiman crocodilus fuscus* (caimán).

Las características morfológicas que diferencian a los caimanes de los cocodrilos son las siguientes: el caimán tiene el hocico corto y ancho, mientras que el del cocodrilo es largo y angosto. Los caimanes presentan un tabique óseo curvo y transversal frente a los ojos; en los cocodrilos este se sustituye por tabiques longitudinales (Alderton 2004).

En los caimanes el cuarto diente mandibular se oculta en una fosa del maxilar superior y no es visible cuando el hocico se cierra, mientras que en los cocodrilos este diente es visible y se adapta a una escotadura al cerrarse el hocico. Además sólo en los caimanes se observa una proyección cutánea en forma de cuernecillo sobre los ojos (Álvarez del Toro 1974).

Entre los cocodrilos existen otras diferencias morfológicas; como la anchura del hocico en el quinto diente maxilar en relación con la distancia comprendida desde la punta del hocico hasta el segundo diente maxilar; la forma de la sutura premaxilo-maxilar y el largo y ancho del hocico (Casas y Aguilar 2007).

Crocodylus acutus (Cuvier 1807)

El cocodrilo Americano, *Crocodylus acutus* (Cuvier 1807) es una de las especies de cocodrilos verdaderos que se distribuye ampliamente en regiones tropicales de norte y Sudamérica (Rodríguez 2007). En México, comúnmente se le conoce (dependiendo de la región o estado) como: caimán, lagarto real, lagarto amarillo, lagarto fino, cocodrilo de río, cocodrilo picudo (COMACROM 2000, Casas y Aguilar 2007).

Descripción

Presenta un hocico notablemente agudo y largo, con una longitud de 1.75 a 2.5 veces más grande que el ancho de la base. Con cinco dientes premaxilares, 13 maxilares y 15 mandibulares. En vista palatina, la sutura premaxilo-maxilar es de forma arqueada. Piel gruesa y cubierta con escudos córneos oscificados en la región dorsal con quillas o crestas muy marcadas.

Presentan de dos a cuatro escudos postorbitales, en una hilera transversal, como mínimo presentan cuatro escudos nucales en dos pares yuxtapuestos. Los escudos nucales y dorsales están ampliamente separados. Los escudos dorsales con osteodermos, arreglados en 16 o 17 hileras transversales alineadas regularmente y 4 o 5 longitudinales, con quillas poco definidas en los costados, pero muy evidentes en el cuello y dorso. Las cuatro filas dorsales longitudinales irregulares se reducen a dos a lo largo de la cola para finalmente reducirse a una en el tercio distal. Las escamas ventrales están arregladas en 27 o 31 series transversales centímetros (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007) .

En animales viejos, la coloración dorsal es café olivo o verde olivo, muy brillante; con numerosas manchas pequeñas negras combinadas con machas grandes en los costados del cuerpo y la cola. Es más clara en juveniles. Las superficies ventrales son de color blanco amarillento con algunas manchas negras en los escudos ventrales y subcaudales. En promedio se pueden encontrar en vida libre con tallas de alrededor de 3 metros; los recién nacidos miden entre 25 y 30 centímetros. Ojos pequeños de color verde-azulado. Boca amarilla. (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007, Rodríguez 2007).

Vive en ríos caudalosos, lagos y lagunas profundas y se le puede encontrar en pantanos, aguas salobres y saladas, así como en lagunas costeras, esteros, marismas, canales, manglares e incluso en las costas y mar abierto (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007, Rodríguez 2007).

Distribución Histórica

Su distribución histórica comprende las costas del Pacífico y el Atlántico desde los Estados Unidos de Norteamérica y México hasta Colombia a través del Caribe y la Isla de Pinos.

En México, se podían encontrar en Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Veracruz , Yucatán y Quintana Roo; desde el Río Fuerte al norte de Sinaloa, hacia el sur por toda las costa del Pacífico y hacia el continente en grandes ríos como las cuencas del Santiago y el Balsas; aunque sus límites en la costa del Golfo de México no han sido muy claros; pero se han encontrado desde el Río Palizada en Campeche y por toda la costa de la Península de Yucatán (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

Distribución Actual

Se sabe que aún quedan poblaciones en relativamente buen estado en Colima, Jalisco, Nayarit y Yucatán (figura 1); aunque es muy probable que otras se encuentren muy reducidas (Chiapas, Michoacán, Oaxaca, Guerrero) (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

Migraciones

Realizan movimientos de un cuerpo de agua a otro en la época de secas o en la época de anidación; las hembras pueden viajar ciertas distancias en busca de un lugar para construir su nido.

Se tienen reportes de organismos vistos en el mar, probablemente en fase de dispersión, yendo de un cuerpo de agua a otro. Esta actividad principalmente se lleva a cabo de noche, en viajes que pueden llegar a ser de varios kilómetros de distancia (Alvarez del Toro 1974, COMACROM 2000).

Estatus

El *C. acutus* se considera en situación vulnerable (VU) por la UICN (Lista Roja 1994) (UICN, 2007) y en la NOM-ECOL-059-2001 se encuentra “sujeta a protección especial” (Pr) (COMACROM 2000, Casas y Aguilar 2007). Dado que es una especie de interés comercial nacional e internacional su comercio se encuentra regulado por la CITES, la cual lo incluye en el Apéndice I (CITES 2008).



Figura 1. Distribución actual de *C. acutus* en México
(Fuente: Casas y Aguilar, 2007)

Crocodylus moreletii (Dumèril y Bibron, 1851)

En México, comúnmente se le conoce como lagarto o cocodrilo negro, pardo o de pantano. En Centroamérica suelen llamarlo lagarto, lagarto del Petén, caimán o alligator. En los Estados Unidos de Norteamérica es morelet's crocodile, Belize crocodile o central american crocodile (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

Descripción

El hocico es redondeado en la punta y relativamente corto, su longitud es 1.5 a 1.7 veces el ancho basal; 13 o 14 dientes maxilares y 15 dientes mandibulares. Tienen una hilera de 4 a 6 escamas post-occipitales, dos pares de escamas nucales en tándem, la primera hilera con cuatro y la segunda con dos, los escamas del tronco separadas de las nucales; las primeras poseen osteodermos más regulares (en comparación con *C. acutus*), 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 (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

La coloración dorsal en los adultos es generalmente amarillo-verdosa y puede llegar a ser casi negra. En los juveniles se presentan pequeños flecos amarillentos formando bandas cruzadas; la superficie ventral es blanca amarillenta y sin marcas. Se distingue fácilmente de *C. acutus*, por presentar en la cola verticilos intercalados en la parte ventral. Ojos saltones y grandes de color pardo-dorado. Boca de color amarillo (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

El tamaño máximo aproximado de esta especie es de 3.50 m; con promedio entre 2.00 a 2.50 m. Las crías cuando nacen miden de 22 a 29 cm de longitud. Se tienen registros aislados en cuanto a la edad máxima que alcanza la especie; un ejemplo de esto es el dato de una hembra capturada en estado adulto que ha vivido por más de 25 años en el zoológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

Habita en arroyos, ciénagas y lagunas que están dentro de bosques y selvas; en ríos de corriente lenta y muy raras veces en ríos caudalosos, no existen reportes de su presencia en aguas salobres. Es común encontrarlo tanto en aguas claras como turbias con abundante vegetación. Esta especie construye cuevas al igual que *C. acutus*. Es probable que realicen pequeños movimientos de un cuerpo de agua a otro.

Distribución Histórica

A nivel mundial se localiza 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 se tienen registros de que habitó los estados de Campeche, Chiapas, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (figura 2) (Álvarez del Toro 1974, Casas y Aguilar 2007).

Distribución Actual

Se sabe que aún existen poblaciones en los mismos estados de su distribución histórica, aunque es muy probable que dichas poblaciones se encuentren disminuidas.

Debido a la implementación de granjas de producción se han introducido individuos a Sinaloa y Colima (figura 2) (Casas y Aguilar 2007).

Estatus

En la NOM-059-ECOL-2001, se encuentra como “sujeta a protección especial” (Pr) y en la UICN se encuentra como en Bajo Riesgo (LR) (Casas y Aguilar 2007). Su comercio se encuentra regulado por la CITES dentro del Apéndice I (CITES 2008).

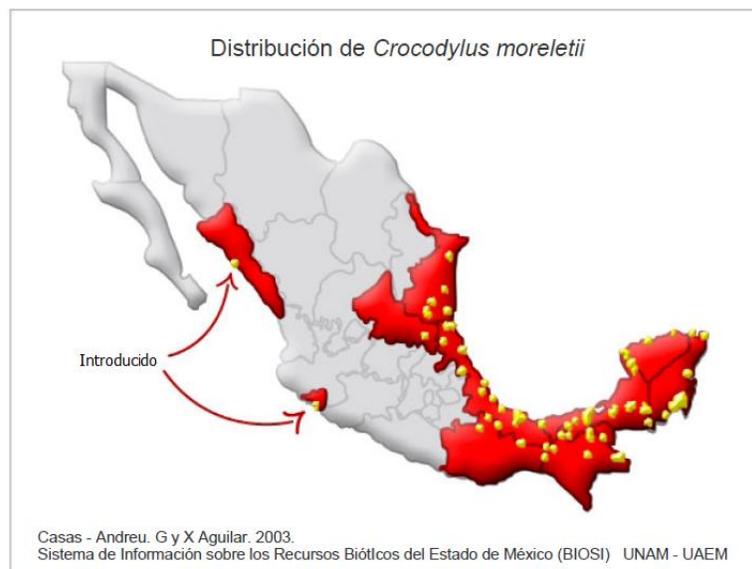


Figura 2. Distribución actual de *C. moreletii* en México
(Fuente: Casas y Aguilar, 2007)

2.5. Genética de la Conservación

La genética de la conservación surge poco después de que la biología de la conservación hiciera evidente varios problemas genéticos asociados con las especies en peligro de extinción (Rocha y Gasca 2007). Dichos cambios genéticos ocurren cuando existe un detrimento demográfico; por ejemplo, se evidenció que cuando hay una disminución en el tamaño efectivo poblacional la diversidad genética se ve disminuida y que la fragmentación del hábitat repercute directamente sobre la estructura poblacional (Hedrick y Miller 1992, Rocha y Gasca 2007).

El objetivo principal de la genética de la conservación ha sido entender y disminuir los problemas genéticos en poblaciones de especies amenazadas o en peligro de extinción, las cuales se encuentran bajo estas categorías cuando sus tamaños poblacionales son pequeños (Rocha y Gasca 2007). Con el estudio y la conservación de las características genéticas, la genética de la conservación busca mantener la adecuación y la capacidad de respuesta evolutiva a cambios ambientales en dichas poblaciones (Moritz 2002).

La genética de la conservación utiliza marcadores moleculares y conceptos genéticos como herramientas para el estudio de la conservación de las poblaciones naturales (Hedrick y Miller 1992). En las últimas tres décadas desde el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y desde la secuenciación de genomas enteros de muchos taxones, la información generada acerca del estado genético de las poblaciones naturales de especies en peligro de extinción o amenazadas ha ido en aumento (Hedrick y Miller 1992, Bowen 1999, Amos y Balmford 2001, Rocha y Gasca 2007, Allendorf y Luikart 2007). Las técnicas moleculares más comúnmente usadas para el estudio de la biología de la conservación son: los análisis de ADN mitocondrial y los análisis con secuencias de ADN nuclear altamente variable; estas se realizan por medio de la amplificación de ADN con PCR (Hedrick y Miller 1992). Estas técnicas moleculares aportan información acerca de la variación genética de la muestra tomada de una población, lo que es importante tomar en cuenta es que dicha información es una aproximación de lo que realmente ocurre en las poblaciones naturales muestreadas (Hedrick y Miller 1992).

La información sobre la variación de las poblaciones generada por medio de análisis genéticos permite estudiar el efecto que tiene la pérdida de la variación genética dentro y entre poblaciones de una especie a causa de la reducción poblacional (cuellos de botella) (Eguiarte y Piñero 1990), así como el efecto de la fragmentación del hábitat, de la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas y el efecto de la acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas a causa de apareamientos endogámicos (Rocha y Gasca 2007).

Además de esto, es posible resolver problemas de tipo taxonómico; es decir, de identificación de especies y subespecies y de establecer las que deben ser prioritarias para su conservación; así como definir las unidades evolutivamente significativas y las unidades de manejo (Petit *et al.* 1998, Bowen 1999, Moritz 2002, Rocha y Gasca 2007). Otro alcance de la aplicación de los marcadores genéticos para objetivos de conservación se encuentra en la identificación de partes y productos de origen animal o vegetal (carne, huesos, pieles, huevos, semillas) que pertenecen a especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo y cuyo comercio se encuentra regulado por la CITES (Rocha y Gasca 2007).

Uno de los efectos que tiene la pérdida de variación a causa de la reducción poblacional es el aumento en los niveles de endogamia; es decir, al aumento en el apareamiento entre individuos más cercanamente relacionados (Eguiarte y Piñero 1990, Hedrick y Miller 1992). Esto es, si una población es pequeña y la especie presenta genes recesivos deletéreos, los apareamientos no se llevarán a cabo al azar, sino entre individuos relacionados y los alelos idénticos por descendencia se encontrarán juntos con mayor frecuencia redistribuyendo las frecuencias de los genotipos aumentando los homócigos para uno de estos genes; entonces la viabilidad de los individuos homócigos disminuye y esto resulta en la disminución de la adecuación en la población (depresión endogámica) (Eguiarte y Piñero 1990, Hedrick y Miller 1992, Rocha y Gasca 2007).

La fragmentación y el deterioro del hábitat obedecen en gran medida al aumento de la actividad humana (Hedrick y Miller 1992, Moritz 2002, Allendorf y Luikart 2007), en la actualidad gran parte de los ecosistemas naturales han sido reducidos a parches (Eguiarte y Piñero 1990), disminuyendo consecuentemente la distribución de las poblaciones naturales, las cuales en muchas ocasiones se encuentran fragmentadas en subpoblaciones y disminuidas en número; este proceso trae como consecuencia pérdida de variabilidad genética, debido a la pérdida de la heterocigosis en la población (Eguiarte y Piñero 1990), además de dificultar el flujo génico entre una subpoblación y otra; es decir, que tiende a disminuir el aporte de genes entre las subpoblaciones formadas y por lo tanto a la diferenciación entre ellas (Aguirre-Planter 2007). La estimación del flujo génico ha ayudado a entender el movimiento de genes en una escala regional y de paisaje, así como a entender dinámicas de extinción y recolonización en poblaciones fragmentadas (Metapoblaciones) (Eguiarte y Piñero 1990, Aguirre-Planter 2007 y Rocha y Gasca 2007).

Con el fin de conservar no sólo las especies y sus ecosistemas sino sus procesos evolutivos, la biología de la conservación se ha apoyado en un conjunto de disciplinas y sus aproximaciones. Estudios sistemáticos, ecológicos y evolutivos han sido incorporados en el estudio del estado de conservación de la diversidad biológica (Moritz 2002, Rocha y Gasca 2007).

Desde el punto de vista taxonómico se ha priorizado la conservación de aquellos taxones que contribuyen a la diversidad global por sus características morfológicas y genéticas y que en gran medida aporten información acerca de la historia evolutiva de las especies (Bowen 1999, Rocha y Gasca 2007). Debido a la pérdida de diferentes ecosistemas y hábitats para las especies a causa de la actividad humana (Bowen 1999, Allendorf y Luikart 2007), los estudios ecológicos han estado enfocados en conservar los ecosistemas junto con los procesos biológicos que dentro de ellos se llevan a cabo (Bowen 1999). Los conocimientos que se tienen en la actualidad acerca de genomas completos y de los procesos evolutivos de diferentes taxones han permitido conocer el estado de conservación de la diversidad genética de muchas especies e identificar a los grupos que son fuente de futura biodiversidad (Rocha y Gasca 2007).

Sin duda, los procesos demográficos, evolutivos y ecológicos de las poblaciones pequeñas interactúan entre sí para que estas persistan o no en el tiempo (Rocha y Gasca 2007). El aporte de información de estas disciplinas en conjunto con los conocimientos generados por medio de nuevas herramientas moleculares y computacionales son claves en el desarrollo de técnicas enfocadas en la conservación de la diversidad biológica (Bowen 1999, Rocha y Gasca 2007).

2.6. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN heredables con múltiples estados de carácter. Dichas diferencias genéticas están influenciadas por la biología de los individuos y por circunstancias externas que afectan a los individuos de una población, tales como patrones de reproducción, migración, tamaño de la población y eventos históricos, lo cual se relaciona con la adecuación y la divergencia de las especies (Parker *et al.* 1998, Sunnucks 2000). Los marcadores moleculares han sido usados para el estudio de la estructura genética de poblaciones, de relaciones filogenéticas entre taxones, en estudios taxonómicos, en el estudio de relaciones de parentesco y de identidad individual; han sido también ampliamente utilizados en el estudio de conservación de especies y en análisis de tipo conductual (Hillis y Moritz 1990, Avise 1992, Avise 1994, Parker *et al.* 1998). A la fecha se han descrito y estudiado un gran número de marcadores moleculares, siendo los más usados las enzimas de restricción, los RFLP's, los AFLP's, los minisatélites, los microsátélites y la secuenciación de diferentes genes pertenecientes al ADN mitocondrial (ADNmt) (Avise 1994, Parker *et al.* 1998, Sunnucks 2000).

2.6.1. ADN Mitocondrial (ADNmt)

EL ADNmt está conformado por una cadena doble circular covalentemente cerrada de 15 a 20 kilobases de largo. Está compuesto por una "región control", con cerca de 1 kb de largo, en la cual se inicia la replicación y la transcripción; y por 37 genes codificantes, de los cuales 22 codifican para ARNs de transferencia (tARNs), 2 para ARNs ribosomales (rARNs) y 13 para ARNs mensajeros (mARNs), específicamente para proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Una de estas proteínas es el Complejo IV o Citocromo C Oxidasa, el cual es un complejo proteico transmembranal que interviene en el último paso de la cadena fosforilativa (Avise 1994, Taberlet 1996, Parker *et al.* 1998).

El ADNmt es heredado a través del linaje materno en todas las especies, debido a que es transmitido asexualmente a través de la madre y su linaje. Por ello el genotipo del ADNmt es referido como *clones o haplotipos*, y sus interrelaciones evolutivas se interpretan como estimados de *filogenia materna*. Desde una perspectiva filogenética, la molécula de ADNmt representa una unidad genealógica no recombinante con múltiples alelos. El ADNmt evoluciona rápidamente a nivel de secuencia (con una tasa mutacional $\mu = 5-10$), debido a la ausencia de algunos mecanismos reparadores conocidos para mutaciones que puedan surgir durante la replicación. (Avise *et al.* 1987, Avise 1994, Taberlet 1996, Hedrick y Miller 1992).

2.6.2. Gen de la Unidad I del Complejo Citocromo C Oxidasa (COI)

El gen COI ha sido frecuentemente usado como marcador molecular en la última década, debido a que por medio de este es posible estimar relaciones evolutivas entre taxones cercanamente relacionados (Folmer *et al.* 1994, Hebert *et al.* 2003, Remigio y Hebert 2003, Eaton *et al.* 2010).

En general, los genes pertenecientes al genoma mitocondrial codificantes para las 13 proteínas son buenos candidatos para ser usados como marcadores moleculares, ya que la prevalencia de deleciones e inserciones (indels) es muy rara a diferencia de los genes ribosomales 12S y 16S (Doyle y Gaut 2000, Hebert *et al.* 2003). Además, este gen posee una alta incidencia de sustitución nucleotídica en la tercera posición, por ello su tasa molecular es cerca de tres veces más alta que la de los genes 12S y 16S (Hebert *et al.* 2003). La evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación no sólo de especies cercanamente relacionadas, sino de grupos filogeográficos de una sola especie, además de resolver casos de reciente divergencia (Simmons y Weller 2001, Hebert *et al.* 2003)

El gen COI ha sido usado en la identificación de productos de origen biológico pertenecientes a especies que han sido sobreexplotadas y que en la actualidad su comercio se encuentra regulado por la CITES (Eaton *et al.* 2010)

2.7. Diversidad Genética e Hibridación entre *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*

Durante la última década por medio de diferentes marcadores moleculares se han realizado estudios sobre diversidad genética y estructura poblacional en diferentes zonas de distribución de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*.

Se ha encontrado baja diversidad genética (H_e : 0.49) en poblaciones de *C. moreletii* en la zona central y norte de Belice, por medio de microsatélites (Dever *et al.* 2002); con valores muy similares a los obtenidos en *Alligator mississippiensis* (heterocigosidad media de 0.46, Glenn *et al.* 1998; y de 0.64, Davis *et al.* 2002). Lo mismo encontraron Ponce-Campos y Dubach (2004) con aloenzimas y minisatélites en *C. acutus* en las costas de Jalisco; y en las poblaciones de *C. moreletii* (por medio de marcadores mitocondriales) en Belice, Guatemala y México por Ray *et al.* (2004). Estos bajos niveles de diversidad también se han encontrado en las poblaciones de Florida de *C. acutus* usando microsatélites (Rodríguez 2007) y en poblaciones del Caribe mexicano de *C. moreletii* y de *C. acutus* con marcadores mitocondriales (Rodríguez 2007, Cedeño *et al.* 2008); con estos mismos marcadores se evidenció baja diversidad genética en la zona de distribución del Pacífico mexicano de *C. acutus* y del Golfo de México de *C. moreletii* (Sánchez-Vilchis 2007) y en cinco poblaciones de *C. acutus* en el Caribe mexicano con ISSRs (Machkour *et al.* 2009). Con la región mitocondrial d-loop Serrano-Gómez (2010) encuentra baja diversidad genética en tres localidades de Oaxaca para *C. acutus*.

Los valores anteriores de diversidad genética han sido comparados con otros estudios realizados en otras especies de cocodrilos que han mostrado valores de diversidad más altos, tal es el caso de *Melanosuchus niger* y *Caiman crocodilus*, los cuales presentaron una diversidad haplotípica de 0.71 y 0.69 (Farias *et al.* 2004), respectivamente. Valores similares (0.73) se encontraron en *C. crocodilus* en el trabajo de Vasconcelos *et al.* (2006). Por otro lado, también se han comparado estos valores con los obtenidos en otras especies de reptiles los cuales han mostrado ser mayores; por ejemplo, las serpientes *Hemorrhois hippocrepis* y *Malpolon monspessulanus* tuvieron valores de diversidad haplotípica de 0.81 y 0.72, y de diversidad nucleotídica de 0.008 y 0.006 respectivamente (Carranza *et al.* 2006). La lagartija de Florida *Sceloporus woodi* (Clark *et al.* 1999) también presenta valores similares a los anteriores y más altos de los que se han encontrado en *C. acutus* y *C. moreletii*, lo mismo ocurre con los valores de diversidad encontrados en especies de tortugas (Avisé *et al.* 1992, Walker y Avisé 1998, Bjørndal *et al.* 2005).

En cuanto a estructura poblacional se han observado valores bajos para *C. moreletii* entre localidades evaluadas de Belice ($F_{st}= 0.062$ y $R_{st}= 0.100$) y con una migración relativamente alta ($Nm= 5.15$) entre localidades más cercanas (modelo estructural de aislamiento por distancia). Un exceso de heterocigos, bajos niveles de endogamia y altos niveles de migración entre subpoblaciones, sugieren escasa estructura poblacional y todo ello sugiere que los individuos se encuentran en movimiento constante entre localidades (Dever et al. 2002).

La misma dinámica poblacional ocurre a lo largo de la costa de Jalisco para *C. acutus* (Ponce-Campos y Dubach 2004) en donde se observaron los mismos alelos en cada población, la misma variación compartida por todas las poblaciones y la distancia genética cercana a cero; por lo que un alto flujo genético ocurre entre las localidades.

Ray et al. (2004) encontraron mayor diferenciación entre subpoblaciones de *C. moreletii* en la localidad Bannana Bank Lagoon cercana a Belice; sin embargo, creen que dicha diferenciación puede deberse al aporte de nuevos alelos por parte de *C. acutus*.

En poblaciones de *C. acutus* en Florida, Rodríguez (2007) encontró baja estructura poblacional; lo mismo ocurre en la Península de Yucatán para *C. acutus* y *C. moreletii* y un modelo de migración de aislamiento por distancia ocurre en las poblaciones de ambas especies. La diferenciación detectada en las poblaciones evaluadas la atribuye a la fragmentación del hábitat de origen antropogénico y a la obstrucción de las rutas de migración.

A lo largo de las zonas de distribución de ambas especies, Sánchez-Vilchis (2007) observó baja estructura; sin embargo, en las poblaciones de *C. moreletii* observó aislamiento por distancia, confirmando diferenciación geográfica en el extremo norte de su distribución; mientras que en las poblaciones de *C. acutus* encuentra mayor diferenciación entre las poblaciones de Oaxaca y el norte de Chiapas atribuyendo esto a una fragmentación alopatrica ocurrida recientemente.

En la Península de Yucatán, Machkour et al. (2009) encontraron valores intermedios de estructura genética ($G_{ST} = 0.296$) y altos índices de endogamia en todas las poblaciones locales de *C. acutus*, siendo los índices más altos los de Banco Chinchorro y los más bajos los de Sian Ka'an; estos datos sugieren que las poblaciones en la Península de Yucatán se encuentran fragmentadas por la actividad turística y que las poblaciones insulares se han encontrado recientemente aisladas.

Algunos de los trabajos anteriores han evidenciado diferentes zonas de hibridación entre las dos especies; tal es el caso de Belice, en donde Ray et al. (2004) encontraron en Bannana Bank Lagoon tres individuos parecidos fenotípicamente a *C. moreletii*, pero con haplotipos propios de *C. acutus* (like *C. acutus*). Estos resultados sugieren introgresión de *C. acutus* dentro del hábitat de *C. moreletii* y evidencian hibridación entre estas dos especies. Los autores creen que los individuos con dichos caracteres podrían pertenecer a una camada nacida cerca del lugar y la cruce entre ambas especies

pudo haber ocurrido 2 o 3 generaciones atrás y que las retrocruzas entre los híbridos iniciales y *C. moreletii* pudieron originar la mayoría de los caracteres fenotípicos, mientras que el haplotipo tipo *C. acutus* permanece intacto por transmisión materna. Además atribuyen que la estructuración de las poblaciones de *C. moreletii* debido al aislamiento por distancia, podría deberse a la introducción de nuevos alelos por parte de *C. acutus*.

En la Península de Yucatán, Rodríguez (2007) identificó 18 híbridos de 34 individuos colectados de *C. moreletii* (alelos compartidos con *C. acutus* y no presentes en individuos puros de *C. moreletii*); y 24 híbridos de 38 individuos de *C. acutus*. La mayoría de los híbridos que encontró se localizaron cerca de zonas costeras en una orientación norte-sur; localizando una zona de hibridación en México y Belice. Debido a la baja frecuencia (0.03) de híbridos encontrados muestra que la mayoría de los eventos de hibridación ocurrieron recientemente y que la presencia de híbridos en las poblaciones de Florida ha disminuido la diversidad genética y el pool genético puro. Los índices de estructura genética disminuyen cuando los individuos híbridos fueron removidos de los análisis, por lo que los individuos híbridos contribuyen a una falsa estructuración. En la misma zona Cedeño *et al.* (2008) encuentran individuos con caracteres morfológicos anómalos en el patrón de escamas y observaron que tres haplotipos puros de *C. acutus* y dos de los 4 haplotipos puros de *C. moreletii* estuvieron presentes en los individuos híbridos, indicando que la hibridación es bidireccional en la Península de Yucatán y ocurre más o menos en la misma proporción en ambas direcciones. Altos índices de introgresión en las poblaciones del Caribe mexicano entre ambas especies fueron reportados por Machkour *et al.* (2009). Se cree que el proceso de hibridación en dicha zona ha ido en detrimento de las poblaciones más pequeñas de *C. acutus*.

En tres localidades de Oaxaca Serrano-Gómez (2010) encuentra en individuos fenotípicamente *C. acutus* 3 haplotipos típicos de *C. moreletii*, esto también ocurre en individuos con caracteres fenotípicamente anómalos; es decir, con patrones de escamación tipo *C. moreletii*, los cuales presentaron haplotipos característicos de esta especie. Debido a que esta no es una localidad de simpatria natural, la hibridación entre las dos especies ha sido resultado de la introducción de individuos *C. moreletii* a zonas de distribución originales de *C. acutus*; por lo que, a diferencia de los trabajos realizados en las áreas de simpatria, en esta zona el origen de la hibridación fue antropogénica.

III. Material y Método

3.1. Área de Estudio

De la recolecta realizada por Serrano-Gómez (2010) para su estudio se usaron 24 muestras sanguíneas y de tejido de ejemplares *C. acutus*. Dichas muestras pertenecen a La Fortuna, Gro., El Médano, Gro., Lagunas de Chacahua, Oax. y Ventanilla, Oax., (cuadro 2 y figura 3). Estas muestras no fueron incluidas en el estudio de Serrano-Gómez (2010). Para la identificación de dichos individuos el autor uso la Guía de Identificación de Cocodrilos de CITES (1995).

También se obtuvieron muestras sanguíneas de *C. moreletii* de individuos que se encuentran en cautiverio en la UMA CICEA (Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas), localizada en Villahermosa, Tabasco y de individuos que se encuentran en Cocodrilos Maya, granja comercializadora de pieles y subproductos de *C. moreletii*, ubicada en Cd. Del Carmen, Campeche. Dichos ejemplares provienen de diferentes localidades de pie de cría y son individuos reproductivos o bien descendientes de estos (cuadro 2 y figura 3). Dichas muestras de tejido sanguíneo se extrajeron del seno venoso occipital (Anexo 1) de acuerdo con las recomendaciones de Mader (1996), usando una aguja hipodérmica y depositándolas en tubos Vacutainer® con EDTA K3 de 4 ml. En las localidades de muestreo anteriores también se tomaron muestras de tejido de escamas, siguiendo la técnica de marcaje de quilla (Anexo 1) (Casas y Aguilar 2007).

Además, el Museo de Zoología del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal, Quintana Roo; donó 60 muestras de escamas, dichas muestras fueron recolectadas por Cedeño (2007) para su estudio realizado en la Península de Yucatán. De estas muestras sólo se secuenciaron 4 individuos de *C. acutus* y 3 de *C. moreletii*, pertenecientes a diferentes localidades (cuadro 2 y figura 3).

Cuadro 2. Localidades de muestreo de *C. acutus* y *C. moreletii*

Especie	Tipo de Tejido	Localidad de Origen / Pie de Cría	No. Indiv.
<i>C. acutus</i> ¹	Sangre	Ventanilla, Oaxaca	4
<i>C. acutus</i> ¹	Sangre	Chacahua, Oaxaca	8
<i>C. acutus</i> ¹	Escama	El Médano, Guerrero	5
<i>C. acutus</i> ¹	Escama	La Fortuna, Guerrero	7
		Total	24
<i>C. moreletii</i> ²	Sangre / Escama* (106)	Laguna de las Ilusiones, Tabasco	5
<i>C. moreletii</i> ³	Sangre	Buenavista, Tabasco	3
<i>C. moreletii</i> ³	Sangre	Cd. Del Carmen, Campeche	2
<i>C. moreletii</i> ³	Sangre / Escama** (210)	El Fénix, Campeche	4
		Total	14
<i>C. acutus</i> ¹	Escama	Boca Paila, Q. Roo	1
<i>C. acutus</i> ¹	Escama	Bacalar Chico, Q. Roo	1
<i>C. acutus</i> ¹	Escama	Laguna Cementerio, Xcalak, Q. Roo	1
<i>C. acutus</i> ¹	Escama	Río Huach, Q. Roo	1
		Total	4
<i>C. moreletii</i> ¹	Escama	Laguna Chetumal. Q. Roo	1
<i>C. moreletii</i> ¹	Escama	Vigía Grande, Reserva de la Biósfera Sian Ka'an, Q. Roo	1
<i>C. moreletii</i> ¹	Escama	Río Hondo, Q. Roo	1
		Total	3
		Total: <i>C. acutus</i>	28
		<i>C. moreletii</i>	17
			45

Lugar en donde se recolectaron las muestras usadas para el presente trabajo. 1: Vida Libre; 2: CICEA, Villahermosa, Tabasco y 3: Cocodrilos Maya, Cd. Del Carmen. *DNA purificado de la escama del individuo 106. ** DNA purificado de la escama del individuo 210.



Figura 3. Ubicación de las localidades de muestro de individuos *C. acutus* ▲ y *C. moreletii* ▲

3.2. Genotipificación

3.2.1. Purificación de ADN

Se purificaron las muestras sanguíneas por medio del kit de extracción de ADN de QiaGen, DNeasy Blood & Tissue, de acuerdo al protocolo (Anexo 2) recomendado por el fabricante (Grupo QIAGEN; Austin, Texas).

Para poder purificar DNA a partir de las muestras de escamas, primero fue necesario pulverizarlas, esto por medio de un taladro eléctrico; y posteriormente se siguió el protocolo recomendado por el kit DNeasy Blood & Tissue (Grupo QIAGEN; Austin, Texas) (Anexo 2). El ADN fue visualizado en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, y cuantificado en un Nanodrop (Thermo Fisher Technologies; Waltham, Massachussets).

3.2.2. Amplificación y Secuenciación del gen mitocondrial la Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI)

El ADN purificado fue amplificado con los iniciadores modificados de Meusnier *et al.* (2008); BarF1 (5'-TCCACTAATCACAARGATATTGGTAC- 3') y MenRev1 (CCTCCGGGTGCCCGAAGAATCAG).

La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, conteniendo 1 U de Taq polimerasa; 2 µl de dNTP's a 0.2 mM; 1 µl de MgCl₂ a 1.5 mM; 2 µl de Buffer 1X; 1 .2 µl de cada primer, cada uno a 0.6 µM y 100 ng de ADN molde. El PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 1 °C por 30 seg., 72 °C por 30 seg., y una extensión final de 5 min a 72 °C. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 56 °C por 30 seg., 72 °C por 30 seg., y una extensión final de 72°C por 5 min. Obteniendo un amplificado de 641 pb.

Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 3% para poder ser recortados y purificados por la técnica de Yoduro-Sodio (Anexo 3).

Una vez que se obtuvieron los fragmentos purificados se realizó la reacción de secuenciación, por medio de un PCR y utilizando el Kit BigDye V. 3.1 Terminator Cycle Sequencing (Grupo QIAGENE; Austin, Texas). Dicha reacción se llevó a cabo en el volumen final de 20 µl, conteniendo 4 µl de Ready Reaction a 0.5 X; 2 µl de Big Dye Buffer a 0.5 X y 1.6 µl de Primer a 3.2 µM.

Se realizaron reacciones de secuenciación en ambos sentidos con los iniciadores BarF1 y el reverso MenRev1; con el objetivo de secuenciar los fragmentos en ambos sentidos y así obtener una mayor confiabilidad de las secuencias, además de asegurar una lectura y alineación más precisa.

Para eliminar los restos de reactivos, los fragmentos amplificados fueron precipitados en columnas con Sephadex G50 (Anexo 4); para posteriormente ser leídos por un Secuenciador ABI 3100 Genetic Analyzer de 16 capilares (Applied Biosystems. Inc).

3.3. Análisis Genéticos

Las secuencias del gen COI obtenidas en los dos sentidos fueron alineadas y editadas con el software Bioedit Ver. 7.0 (Hall 1999), obteniendo fragmentos finales de 641 pb.

Se realizó un alineamiento múltiple con secuencias de otras especies del género *Crocodylus*, obtenidas del GeneBank NCBI; *C. acutus* (GQ144571.1; Eaton *et al.* 2010) y *C. porosus* (DQ273698.1; Li *et al.* 2007) esto por medio de un Clustal W, implementado en Bioedit Ver. 7.0 (Hall 1999); se realizó una revisión de las secuencias a ojo en el mismo programa.

3.3.1. Diversidad Genética

Para evaluar la diversidad genética con polimorfismos basados en secuencias; primero se evaluó la composición nucleotídica por especie de los fragmentos obtenidos del gen COI, esto por medio del software MEGA Ver. 4.0 (Tamura *et al.* 2007). Se calcularon las probabilidades de sustituciones transicionales y transversionales con el método de sustitución nucleotídica de Maxima Verosimilitud Compuesta y el número de sitios polimórficos, esto por medio del software MEGA Ver. 4.0 (Tamura *et al.* 2007) y DnaSP Ver. 4.10. (Rozas *et al.* 2003).

Se estimó la diversidad Haplotípica (h), la cual es una medida de heterocigocidad media (proporción de los heterocigos por locus en una población que se reproduce al azar; (Nei 1987); y la diversidad nucleotídica (π), definida como la media del número de cualquier diferencia nucleotídica o sustitución por sitio para un grupo de secuencias (alelos) de ADN muestreadas (Nei 1987, Nei y Miller 1990), estimada con la corrección Jukes y Cantor (1969), donde las diferencias observadas son convertidas a la media del número de sustituciones nucleotídicas por sitio (δ_{xy}) entre dos secuencias (Lynch y Crease 1990). Cada uno de estos estadísticos fueron calculados para cada especie mediante el software DnaSP Ver. 4.10. (Rozas *et al.* 2003).

Para evaluar si las secuencias obtenidas se encuentran sujetas a procesos de selección se realizaron pruebas de neutralidad con el estadístico D de Tajima (Tajima 1989); el cual está basado en las diferencias entre los sitios segregantes (S) y la media del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (π). Además, se evaluaron los estadísticos D y F (Fu y Li 1993); el primero se basa en las diferencias entre el número total de singletons (η_s ; mutaciones que aparecen sólo una vez entre las secuencias) y el número total de mutaciones (η), mientras que el segundo se basa en las diferencias entre el número total de singletons y la media del número de diferencias nucleotídicas

entre pares de secuencias (k). Estas pruebas se realizaron para las secuencias de cada especie, y fueron implementadas en el programa DnaSP v.4.10 (Rozas *et al.* 2003).

3.3.2. Red Mínima de Haplotipos

Se estimó una red mínima de haplotipos, la cual estima las genealogías de genes de secuencias de ADN bajo los estadísticos de parsimonia implementados por Templeton (1992). Esto por medio del programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000). La red se construye de manera no enraizada usando un límite de parsimonia de 0.95.

El número de diferencias mutacionales significativas asociadas con el límite de probabilidad del 95% conecta el número máximo de mutaciones entre pares de secuencias (Templeton *et al.* 1992, Templeton *et al.* 1995, Clement *et al.* 2000). El resultado es una red de haplotipos conectados por el número mínimo de pasos mutacionales entre ellos.

3.3.3. Relaciones de similitud con un modelo de distancia genética

Debido a que el gen COI es un gen codificante, las reconstrucciones filogenéticas se realizaron con modelos de sustitución nucleotídica que toman en cuenta la tasa de sustitución transicional, transversional, sinónimas y no sinónimas. Por ello se usó el método de distancia Neighbor Joining, con un modelo de sustitución nucleotídica de Máxima Verosimilitud Compuesta; tomando en cuenta Transiciones y Transversiones y con 10000 réplicas de bootstrap y con el modelo de sustitución de Nei-Gojobori (1986) usando la distancia de las sustituciones sinónimas y no sinónimas y con 10000 réplicas de bootstrap. Además, se usó el modelo Kimura dos parámetros, con el cual se obtiene una menor varianza de los datos. Todo esto se realizó con el programa MEGA Ver. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Con el fin de evaluar la diferencia que existe entre diferentes especies, se tomaron cuatro secuencias del GeneBank, pertenecientes a las especies *Crocodylus nitloticus* (GQ144590.1), *C. porosus* (DQ273698.1), *C. siamensis* (DQ353946.1) y *Mecistops cataphractus* (GQ144581.1) comparándolas con los haplotipos más frecuentes muestreados en este trabajo para *C. acutus* y *C. moreletii*. Para ello se calcularon las distancias genéticas pareadas con un método de sustitución nucleotídica que toma en cuenta la tasa de sustitución sinónima y no sinónima, por ello se usó el método de sustitución nucleotídica de Nei-Gojobori (1986) calculadas según Nei y Kumar (2000) e implementadas en MEGA Ver. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

3.3.4. Estructura Poblacional

Para evaluar la diferenciación se calcularon las distancias genéticas entre especies (*C. acutus* vs. *C. moreletii*), entre las localidades de cada especie y dentro de cada localidad. Debido a la naturaleza codificante del gen COI se usó un método de sustitución nucleotídica que toma en cuenta la tasa de sustitución sinónima y no sinónima, por ello se usó el método de sustitución nucleotídica de Nei-Gojobori (1986), usando las sustituciones sinónimas y con 1000 réplicas de bootstrap. Las distancias fueron calculadas según Nei y Kumar (2000) e implementadas en MEGA Ver. 4.0 (Tamura et al. 2007).

Otro estadístico implementado para calcular la diferenciación fue la Divergencia Nucleotídica, como la media del número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre diferentes poblaciones (D_{XY}), con la corrección Jukes y Cantor (1969) (Nei 1987); implementada en DnaSP Ver. 4.10. (Rozas et al. 2003).

Además, se calculó la F_{ST} (Wright 1951), la cual estima la frecuencia de los alelos en cada locus en diferentes subpoblaciones (Hudson *et al.* 1992 a, Lynch y Crease 1990). A partir de este estadístico se calculó la N_m , que determina el número efectivo de individuos migrantes por generación (Hudson *et al.*, 1992b; Templeton *et al.*, 1995); estos fueron implementados en el DnaSP v.4.10. (Rozas *et al.*, 2003) con 1000 réplicas de bootstrap.

Para estimar la correlación de diversidad haplotípica en diferentes niveles de jerarquía y la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones (Excoffier *et al.* 1992; Bonin *et al.* 2007), se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) basado en el estadístico Φ , calculado a partir de las distancias pareadas entre todos los pares de haplotipos. El modelo de sustitución empleado para la distancia molecular fue el de Tamura y Nei (Tamura y Nei 1993) con un nivel de significancia de 0.05 y 10 000 permutaciones al azar. Para estos análisis se utilizó ARLEQUÍN Ver 3.0 (Excoffier *et al.* 2005).

IV. Resultados

Se obtuvieron 46 secuencias de 641 pb pertenecientes al gen de la Citocromo Oxidasa subunidad I (COI); 29 de *C. acutus* y 17 de *C. moreletii*.

4.1. Diversidad Genética del Gen COI en *C. acutus* y *C. moreletii*

El porcentaje de composición nucleotídica fue similar en ambas especies. El 28% de las secuencias están compuestas por Timina, en el mismo porcentaje se encuentra representada la Citocina y la Adenina; mientras que la Guanina está representada con el 16% .

En el cuadro 3 se muestran las probabilidades de sustitución nucleotídica. Los valores más altos corresponden a las tasas de sustitución transicionales (en negritas). Las tasas de sustitución transversionales tienen menor probabilidad de ocurrir; sin embargo, la mayor probabilidad transversional ocurre en un cambio de A a C y de G a C. Las frecuencias nucleotídicas son 0.269 (A), 0.28 (T/U), 0.283 (C) y 0.168 (G). La tasa de transición/transversión para purinas es de 15.394 y para pirimidinas de 8.257. La tasa total de transición/transversión es de $R = 4.977$.

Cuadro 3. Patrones de sustitución nucleotídica estimados con Máxima Verosimilitud Compuesta

	A	T	C	G
A	-	2.1	2.12	19.3
T	2.01	-	17.49	1.25
C	2.01	17.31	-	1.25
G	30.94	2.1	2.12	

En el cuadro 4 se presentan los sitios polimórficos de todas las secuencias obtenidas, usando como referencia una secuencia de *C. acutus* (GQ144571.1; Eaton *et al.* 2010); en este se pueden apreciar los cambios en las secuencias y los sitios conservados. Tres individuos de Chacahua (46, 48, 50) y dos de Quintana Roo (99 y 274) -*C. acutus* morfológicamente- presentan cambios nucleotídicos muy similares a los individuos *C. moreletii*. Mientras que dos individuos de Buenavista (204 y 206) y uno de Quintana Roo (149) –*C. moreletii* morfológicamente- presentan cambios nucleotídicos similares a las secuencias de *C. acutus*. Estos 8 individuos son los que han sido descartados de ciertos análisis, con el fin de no sobreestimarlos.

Cuadro 4. Sitios Polimórficos encontrados en las secuencias evaluadas en comparación con una secuencia de *C. acutus* tomada del GeneBank (GQ144571.1)

		111123	3444455555	55556666
		3346117893	7113502344	66771122
		6701147941	2145078569	17045717
<i>C. acutus</i>				
<i>*C acutus</i> COI		AGACCCACAG	AAGTGACTGA	GCTCACAT
VenOax	16
	22
	26A
	29A
ChacOax	56
	44G.
	60
	63
	46TGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	48TGTC	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	50TTGTC.	GGACAGT.A.	A.CTG..A
	106
LForGro	F1	..T.....
	F2	..T.....
	F3
	F4C....A
	F5
	F6
	F7
MedGro	M11
	M12
	M13
	M14
	066
BoPaQR	099TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
BaChQR	108
CXcaQR	223
RHuaQR	274TGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
<i>C. moreletii</i>				
IluTab	103TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTGC.A
	104	.A..TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	105TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	106TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	107TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
BueTab	201TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	204A
	206A
CaCamp	202TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	203	G...TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
FxCamp	205TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	210TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	214	...GTTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
	215TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A
RHonQR	149A
LCheQR	065TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTGG.A
SKQRoo	098TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A

La primer secuencia (*) es la de referencia y fue tomada del GeneBank (GQ144571.1). Los números superiores corresponden a la posición (en pb) de los sitios. Los números corresponden a la identificación de los ejemplares. Ventanilla, Oax (VenOax); Chacahua, Oax. (ChacOax); La Fortuna, Gro. (LForGro); El Médano, Gro. (MedGro); Laguna de la Ilusiones, Tab. (IluTab); Buenavista, Tab. (BueTab); Ciudad del Carmen; Camp. (CaCamp); El Fénix, Camp. (FxCamp); Quintana Roo: Boca Paila, (BoPaQR); Bacalar Chico (BaChQR); Cementerio Xcalak (CXcaQR); Río Huach; Río Hondo (RHonQR); Laguna Chetumal (LCheQR); Sian Ka'an (SKQRoo).

En el cuadro 5 se presentan la secuencia de cada haplotipo encontrado, así como su frecuencia. Los haplotipos con mayor frecuencia son el haplotipos Ca I y Cm I. Los haplotipos Cm VI a Cm VIII corresponden a individuos identificados morfológicamente como *C. acutus*. Por ello, cuando estos individuos son descartados el total de haplotipos puros para ambas especies es de 5 (cuadros 6 y 7).

Cuadro. 5. Sitios polimórficos que definen a cada haplotipo encontrado

	111123	3444455555	55556666	
	3346117893	7113502344	66771122	
	6701147941	2145078569	17045717	Frec.
<i>C. acutus</i>				
* <i>C acutus</i> COI	AGACCCACAG	AAGTGACTGA	GCTCACAT	
Ca I	17
Ca IIA	5
Ca IIIG.	1
Ca IV	..T.....	2
Ca VC...A	1
<i>C. moreletii</i>				
Cm ITTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTGC.A	11
Cm IITTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTGG.A	1
Cm III	.A..TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A	1
Cm IV	G...TTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A	1
Cm V	...GTTGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A	1
Cm VITGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A	2
Cm VIITGTC.	GGACAGTCAC	ATCTG..A	1
Cm VIIITTGTC.	GGACAGT.A.	A.CTG..A	1

La primer secuencia (*) es la de referencia y fue tomada del GeneBank (GQ144571.1).
Los números superiores corresponden a la posición (en pb) de los sitios.

En los cuadros 6 y 7 se presentan la diversidad haplotípica y nucleotídica por especie y por localidades. Se observaron 5 haplotipos y 4 sitios polimórficos para cada especie, comparando las secuencias obtenidas con la secuencia de *C. acutus* tomada del GeneBank (GQ144571.1; Eaton *et al.* 2010), la cual presentó el haplotipo Ca I.

La diversidad haplotípica evaluada fue de 0.632 (± 0.1030) para *C. acutus* y 0.647 (± 0.120) para *C. moreletii* (cuadros 6 y 7, respectivamente). Mientras que la diversidad nucleotídica para *C. acutus* fue de 0.0109 (± 0.0027) y para *C. moreletii* de 0.0106 (± 0.0035), (cuadros 6 y 7, respectivamente). Sin embargo, los valores encontrados en este trabajo pueden estar influenciados por las secuencias de los individuos que tienen un haplotipo propio de la especie contraria; por lo que en un segundo

análisis se descartaron dichas secuencias; disminuyendo así, los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica.

La diversidad haplotípica para *C. acutus* disminuyó a 0.455 (± 0.123), (cuadro 6); mientras que para *C. moreletii* disminuyó a 0.505 (± 0.158), (cuadro 7). La diversidad nucleotídica para ambas especies disminuye hasta 0.0009 (± 0.0003).

A pesar de que se descartaron los individuos que presentaron haplotipos atípicos en un segundo análisis con el fin de disminuir el riesgo de sobreestimar los valores de diversidad y aunque el número de sitios segregantes (S) y el número de haplotipos (H) haya disminuido; los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica podrían estar sesgados debido al pequeño tamaño de muestra.

Este es el caso de Chacahua (individuos clasificados morfológicamente como *C. acutus*), en donde 3 de los 8 individuos analizados fueron descartados en el segundo análisis por presentar haplotipos atípicos; el número de sitios polimórficos disminuyó tanto que sólo un sitio hace la diferencia entre 2 haplotipos presentados; así la diversidad haplotípica disminuye de 0.786 a 0.4 y la diversidad nucleotídica disminuye de 0.0177 a 0.0006 (cuadro 6). Lo mismo ocurre en las cuatro localidades muestreadas del estado de Quintana Roo, en donde 2 individuos de 4 presentaron haplotipos atípicos; el número de sitios polimórficos disminuyó hasta cero y por lo tanto sólo se observa un sólo haplotipo (cuadro 6).

En cuanto a las localidades muestreadas para los individuos clasificados morfológicamente como *C. moreletii*, se presentaron 3 haplotipos atípicos. Dos de ellos pertenecientes a Buenavista, y debido a que dos de las secuencias quedan fuera del segundo análisis, no fue posible realizar estimados de diversidad genética con una sola secuencia (cuadro 7).

En el caso del estado de Quintana Roo, se descartó una secuencia y el número de sitios polimórficos disminuyó hasta 1, por lo que los valores de diversidad haplotípica (1.00) y nucleotídica (0.0016) se encuentran sobre y subestimados, respectivamente (cuadro 7).

Es importante resaltar que cuando se descartan los haplotipos atípicos el número total de sitios polimórficos disminuye de 24 a 4 en ambos casos.

Cuadro 6. Diversidad haplotípica y nucleotídica en las localidades de *C. acutus*.

	No. Indiv.	No. Sitios Polimórficos S	No. De Haplotipos H	Div. Haplotípica h [±e.s]	Div. Nucleotídica π (JC) [±e.s]
Ventanilla, Oax.	4	1	2	0.667 [0.2040]	0.0011 [0.0003]
<u>Chacahua, Oax.</u>	8	23	5	0.786 [0.1510]	0.0177 [0.0039]
	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>0.400</u> [0.2370]	<u>0.0006</u> [0.0003]
La Fortuna, Gro.	7	3	3	0.667 [0.1600]	0.0016 [0.0006]
El Medano, Gro.	5	0	1	0.000 [0.0000]	0.0000 [0.0000]
<u>Quintana Roo</u>	4	21	3	0.833 [0.2220]	0.0221 [0.0064]
	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0.000</u> [0.0000]	<u>0.0000</u> [0.0000]
<i>C. acutus</i>	28	24	9	0.632 [0.1030]	0.0109 [0.0027]
	<u>23</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>0.455</u> [0.1230]	<u>0.0009</u> [0.0002]

Localidades subrayadas presentaron haplotipos atípicos; el segundo análisis sin haplotipos atípicos se encuentra en un segundo renglón y con valores subrayados. π (JC) es la diversidad nucleotídica con corrección Jukes and Cantor y [±e.s] es el error estándar

Cuadro 7. Diversidad haplotípica y nucleotídica en las localidades de *C. moreletii*

	No. Indiv.	No. Sitios Polimórficos S	No. De Haplotipos H	Div. Haplotípica h [±e.s]	Div. Nucleotídica π (JC) [±e.s]
Lag. Ilusiones, Tab.	5	1	2	0.400 [0.2370]	0.0006 [0.0003]
<u>Buenavista, Tab.</u>	3	20	2	0.667 [0.3140]	0.0213 [0.0098]
	<u>1</u>	-	-	-	-
Campeche	6	2	3	0.600 [0.2150]	0.0011 [0.0004]
<u>Quintana Roo</u>	3	21	3	1.000 [0.2720]	0.0223 [0.0090]
	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>1.000</u> [0.5000]	<u>0.0016</u> [0.0007]
<i>C. moreletii</i>	17	24	6	0.647 [0.1200]	0.0106 [0.0035]
	<u>14</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>0.505</u> [0.1580]	<u>0.0009</u> [0.0003]

Localidades subrayadas presentaron haplotipos atípicos; el segundo análisis sin haplotipos atípicos se encuentra en un segundo renglón y con valores subrayados. π (JC) es la diversidad nucleotídica con corrección Jukes and Cantor y [±e.s] es el error estándar

Las Pruebas de Neutralidad muestran valores que no son significativamente diferentes de cero, por lo que las secuencias analizadas pertenecientes al gen COI no se encuentran sujetas a selección (cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de los estadísticos de Neutralidad

Especie	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	No. Sitios segregantes	No. Total Mutaciones	Media dif. nucleotídicas	Diversidad Nucleotídica
	(Tajima, 1989)	(Fu y Li, 1993)	(Fu y Li, 1993)	S	[No. Singletons]	K	π
<i>C. acutus</i>	0.4443 (P>0.10)	1.1437 (P>0.10)	1.0825 (P>0.10)	24	24 [2]	6.872	0.0109
<i>C. moreletii</i>	-0.2556 (P>0.10)	0.7507 (P>0.10)	0.5367 (P>0.10)	24	24 [4]	6.647	0.0104

6.2. Red Mínima de Haplotipos

La red mínima de haplotipos construida únicamente con individuos identificados morfológicamente como *C. acutus* (figura 4) muestra el agrupamiento de 5 haplotipos cercanos entre sí; un haplotipo ancestral (Ca I) del cual divergen por un paso mutacional tres haplotipos (Ca II, Ca III y Ca IV) y un haplotipo que diverge por dos pasos mutacionales (Ca V); todos ellos se agruparon con un 99% de parsimonia. Los seis individuos que presentaron patrones de sustitución propios de *C. moreletii* (cuadro 4) no se conectaron al primer grupo ni con el 90% de parsimonia, lo que muestra una clara diferenciación entre estos dos grupos; sin embargo, estos individuos se conectaron entre sí con un 99% de parsimonia, presentando los haplotipos propios de *C. moreletii* (Cm I, Cm VI, Cm VII y Cm VIII).

Los individuos identificados morfológicamente como *C. moreletii* se agruparon entre sí con un 99% de parsimonia. Se observó un haplotipo ancestral (Cm I) del cual divergen cuatro (Cm II, Cm III, Cm IV y Cm V) por un paso mutacional (figura 5). Sin embargo los tres individuos (2 de Buenavista y uno de Río Hondo) que presentaron patrones de sustitución propios de *C. acutus* (cuadro 4) se agruparon en un haplotipo identificado como Ca II (figura 4) el cual no se agrupó con el resto de los haplotipos ni con el mínimo porcentaje de parsimonia (90%).

En la red construida con todos los individuos evaluados (figura 6) se muestra con más detalle el agrupamiento de individuos híbridos. En esta se muestran los dos grupos principales, el de individuos morfológicamente identificados como *C. acutus* y el de los individuos identificados como *C. moreletii*; en ambos grupos se observan los individuos que convergen en el grupo de la especie contraria, como lo muestra también el cuadro de haplotipos (cuadro 9).

En el grupo de haplotipos propios de *C. acutus* se agruparon tres individuos identificados morfológicamente como *C. moreletii* y que presentan el haplotipo Ca II (proveniente de Ventanilla, Oax.); mientras que en el grupo de haplotipos de *C. moreletii*, se encuentran cinco individuos identificados como *C. acutus*. El individuo proveniente de Boca Paila presenta el haplotipo Cm I y los individuos provenientes de Chacahua presentan haplotipos propios de *C. moreletii*, pero que no se encuentran presentes en ningún individuo *C. moreletii* colectado. Además al igual que en las figuras anteriores, existe una clara separación entre estos dos grupos.

La figura 7 y el cuadro 10 muestran la distribución geográfica de los haplotipos encontrados, se observan los haplotipos ancestrales para cada especie (Ca I para *C. acutus* y Cm I para *C. moreletii*), ampliamente distribuidos en las localidades de muestreo.

En La Fortuna, además del haplotipo más frecuente (Ca I) presenta dos haplotipos exclusivos, Ca II y Ca V. Mientras que en el Médano sólo se muestreo el haplotipo más frecuente, el Ca I. La localidad de Chacahua, además de presentar 2 haplotipos propios de *C. acutus* (Ca I y Ca III), se encontraron 3 individuos con haplotipos agrupados dentro del grupo de *C. moreletii* (Cm VI, VII y VIII), aunque estos haplotipos no se observaron en ningún otro individuo evaluado e identificado morfológicamente como *C. moreletii*. El haplotipo Ca II encontrado en individuos *C. acutus* de Ventanilla, también se encuentra presente en dos individuos *C. moreletii* de Buenavista, Tabasco y uno proveniente de Río Hondo, Quintana Roo.

Dos individuos clasificados como *C. acutus* de dos localidades de Quintana Roo, Boca Paila y Río Huach muestran haplotipos propios de *C. moreletii* (Cm I y Cm VI, respectivamente), mientras que los individuos de Bacalar Chico y Punta Xcalac presentaron el haplotipo más frecuente muestreado para *C. acutus* (Ca I).

En Laguna de las Ilusiones, la mayoría de los individuos presentaron el haplotipo más frecuente para *C. moreletii*, el Cm I y sólo un individuo presentó el haplotipo Cm III. Buenavista, además de presentar a dos individuos con haplotipos propios de *C. acutus*, se muestreó sólo un individuo con el haplotipo Cm I. Los individuos provenientes de Cd. del Carmen y del Fénix presentaron el haplotipo Cm I, y en cada una de esta localidades se muestrearon individuos con haplotipos exclusivos y que divergen del primero sólo por un paso mutacional (Cm IV y Cm V, respectivamente). Los individuos de Sian Ka'an y Laguna Chetumal presentaron haplotipos propios de *C. moreletii* (Cm I y Cm II, respectivamente).

Cuadro 9. Haplotipos encontrados en cada localidad muestreada

Haplotipo	Localidad	Especie	Individuos
Ca I	Ventanilla, Oax.	<i>C. acutus</i>	16, 22
	Chacahua, Oax.	<i>C. acutus</i>	56, 60, 63, 106
	La Fortuna, Gro.	<i>C. acutus</i>	F3, F5, F6, F7
	El Médano, Gro.	<i>C. acutus</i>	M11, M12, M13, M14, 66
	Bacalar Chico, Q. Roo	<i>C. acutus</i>	108
	Laguna Cementerio, Xcalak, Q. Roo	<i>C. acutus</i>	223
Ca II	Ventanilla, Oax.	<i>C. acutus</i>	26, 29
	Buenavista, Tab.	<i>C. moreletii</i>	204, 206
	Río Hondo, Q. Roo	<i>C. moreletii</i>	149
Ca III	Chacahua, Oax.	<i>C. acutus</i>	44
Ca IV	La Fortuna, Gro.	<i>C. acutus</i>	F1, F2
Ca V	La Fortuna, Gro.	<i>C. acutus</i>	F4
Cm I	Laguna de las Ilusiones, Tab.	<i>C. moreletii</i>	103, 105, 106, 107
	Buenavista, Tab.	<i>C. moreletii</i>	201
	Ciudad del Carmen, Camp.	<i>C. moreletii</i>	202
	El Fénix, Camp.	<i>C. moreletii</i>	205, 210, 215
	Sian Ka'an, Q. Roo	<i>C. moreletii</i>	98
	Boca Paila, Q. Roo	<i>C. acutus</i>	99
Cm II	Laguna Chetumal, Q. Roo	<i>C. moreletii</i>	65
Cm III	Laguna de las Ilusiones, Tab.	<i>C. moreletii</i>	104
Cm IV	Ciudad del Carmen, Camp.	<i>C. moreletii</i>	203
Cm V	El Fénix, Camp.	<i>C. moreletii</i>	214
Cm VI	Chacahua, Oax.	<i>C. acutus</i>	46
	Río Huach, Q. Roo	<i>C. acutus</i>	274
Cm VII	Chacahua, Oax.	<i>C. acutus</i>	48
Cm VIII	Chacahua, Oax.	<i>C. acutus</i>	50

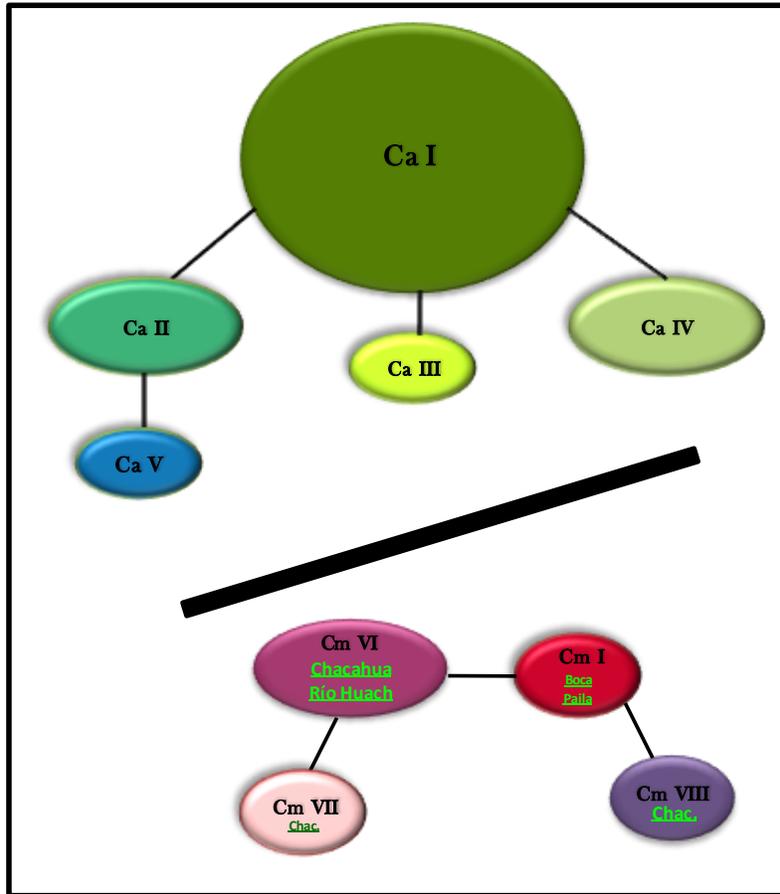


Fig. 4. Red mínima de haplotipos de los individuos identificados morfológicamente como *C. acutus*.
 Líneas oscuras, soportadas por un 99% de parsimonia y líneas delgadas, soportadas por el 90% de parsimonia.
 El tamaño de círculos corresponde a la frecuencia del haplotipo.

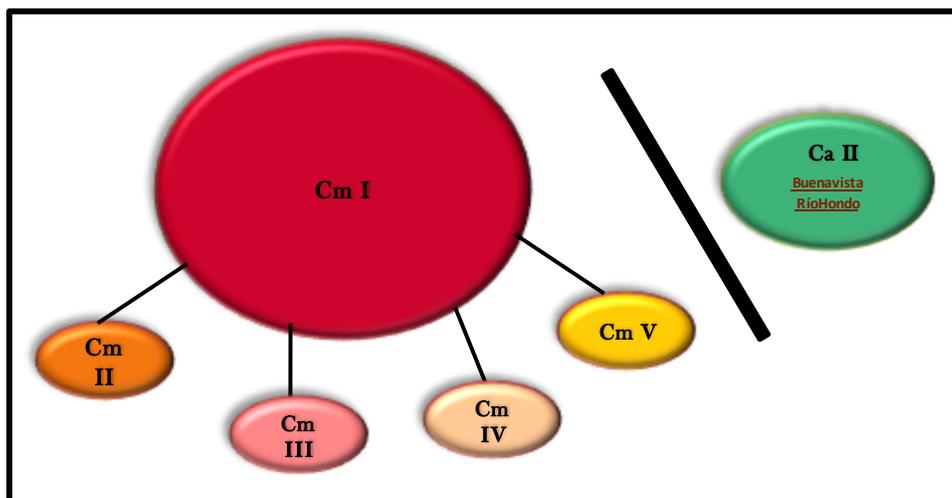


Fig. 5 Red mínima de haplotipos de los individuos identificados morfológicamente como *C. moreletii*.
 Líneas oscuras, soportadas por un 99% de parsimonia y líneas delgadas, soportadas por el 90% de parsimonia.
 El tamaño de círculos corresponde a la frecuencia del haplotipo.

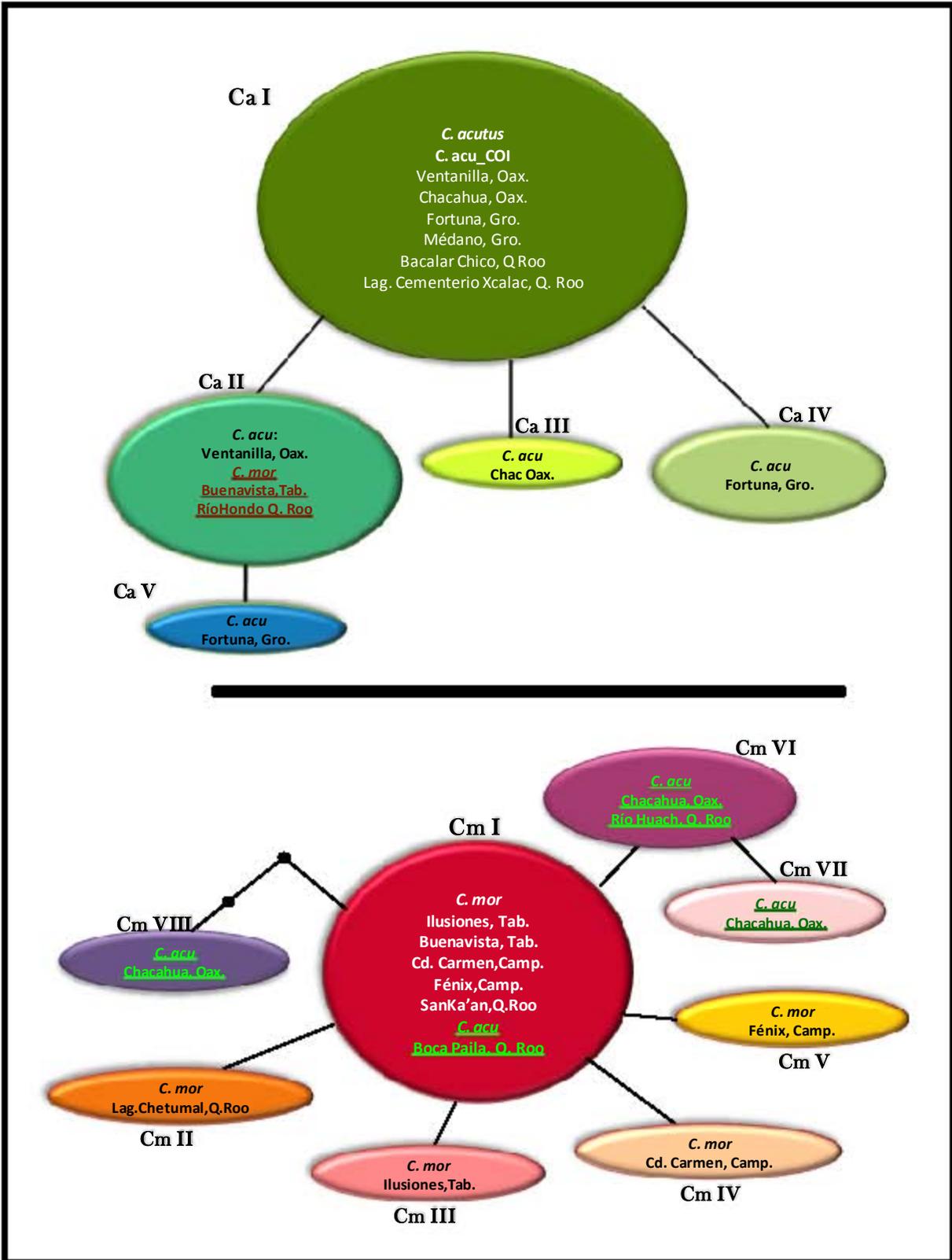


Fig. 6. Red mínima de haplotipos. Muestra el número de haplotipos por especie.

Líneas oscuras, soportadas por un 99% de parsimonia y líneas delgadas, soportadas por un 90% de parsimonia.

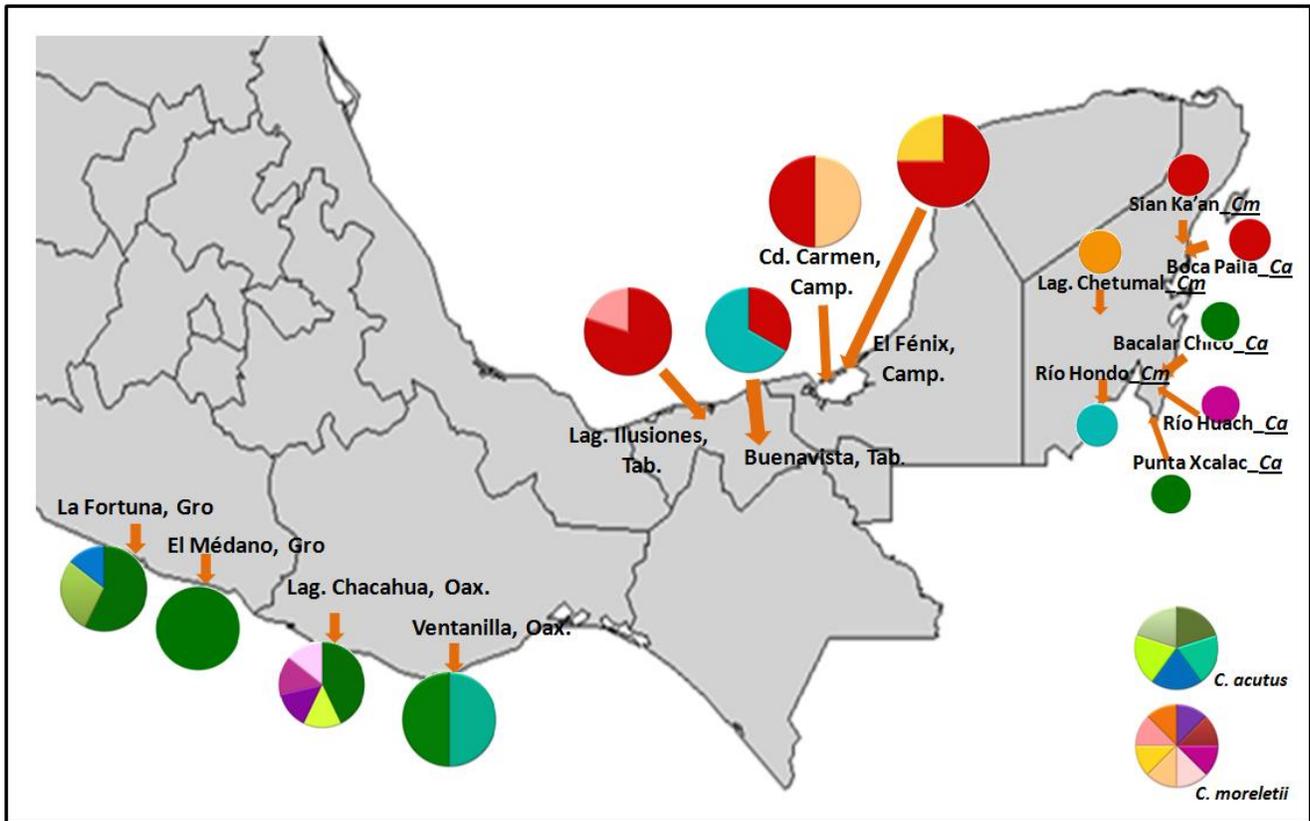


Fig. 7. Distribución de los Haplotipos en las localidades de muestreo de ambas especies.
Ca: Individuo identificado morfológicamente como *C. acutus*; Cm: individuo identificado como *C. moreletii*

Cuadro 10. Distribución de haplotipos

Localidad	Haplotipo	N	Especie
La Fortuna, Gro.	Ca I, Ca IV y Ca V	7	<i>C. acutus</i>
El Médano, Gro.	Ca I	5	<i>C. acutus</i>
Lag. Chacahua, Oax.	Ca I, Ca III, Cm VI, Cm VII y Cm VIII	8	<i>C. acutus</i>
Ventanilla	Ca I y Ca II	4	<i>C. acutus</i>
Boca Paila, Q. Roo	Cm I	1	<i>C. acutus</i>
Bacalar Chico, Q. Roo	Ca I	1	<i>C. acutus</i>
Lag. Cementerio, Xcalak, Q. Roo	Ca I	1	<i>C. acutus</i>
Río Huach, Q. Roo	Cm VI	1	<i>C. acutus</i>
Lag. Ilusiones, Tab.	Cm I y Cm III	5	<i>C. moreletii</i>
Buenavista, Tab.	Cm I y Ca II	3	<i>C. moreletii</i>
Cd. Del Carmen, Camp.	Cm I y Cm IV	2	<i>C. moreletii</i>
El Fénix, Camp.	Cm I y Cm V	4	<i>C. moreletii</i>
Lag. Chetumal, Q. Roo	Cm II	1	<i>C. moreletii</i>
Vigía Grande, Sian Ka'an, Q. Roo	Cm I	1	<i>C. moreletii</i>
Río Hondo, Q. Roo	Ca II	1	<i>C. moreletii</i>

4.3. Relaciones de similitud con un modelo de distancia genética

Los árboles filogenéticos construidos por medio de Neighbor joining y con los modelos de sustitución nucleotídica Kimura-2-parámetros y Máxima Verosimilitud compuesta (figura 8) fueron reconstrucciones muy similares, por lo que sólo se muestra el correspondiente al segundo modelo.

En la reconstrucción con Máxima Verosimilitud Compuesta se observa, al igual que en la red; el agrupamiento de los haplotipos propios de *C. acutus* y de *C. moreletii*. Pero en el clado que comprende el agrupamiento de haplotipos de *C. acutus*, se agruparon individuos identificados fenotípicamente como *C. moreletii*, los cuales provienen de Buenavista, Tabasco y de Río Hondo, Quintana Roo. En el clado que comprende el agrupamiento de haplotipos propios de *C. moreletii* se agruparon individuos identificados fenotípicamente como *C. acutus*, los cuales provienen de Lagunas de Chacahua, Oaxaca, Río Huach y Boca Paila, Quintana Roo.

En el grupo de *C. acutus*, los haplotipos Ca I, Ca IV y Ca III son los más similares entre ellos, estos se separan de Ca II y Ca V, siendo el haplotipo encontrado en la Fortuna (Ca V) el haplotipo más basal y el haplotipo Ca II el que presentan los tres individuos identificados como *C. moreletii*.

En el grupo de los *C. moreletii*, los haplotipos que presentaron los individuos identificados como dicha especie muestran poca diferenciación entre ellos (Cm I a Cm V), agrupándose todos en un mismo clado; sin embargo existe cierta diferenciación con los haplotipos propios de *C. moreletii* que presentaron los individuos identificados como *C. acutus* provenientes de Chacahua y de Río Huach (con los haplotipos Cm VI, Cm VII y Cm VIII); sin embargo, el individuo identificado como *C. acutus* proveniente de Boca Paila (Quintana Roo) presentó el haplotipo más común de *C. moreletii* (Cm I).

El mismo tipo de agrupamiento ocurre en la reconstrucción con sustituciones sinónimas (Método Nei – Gojobori) (figura 9). En el grupo de *C. acutus* se encuentran los haplotipos Ca I, Ca IV y Ca VI como los menos diferenciados entre ellos, y estos se separan de Ca II y Ca V, que se encuentran en otro clado. Los haplotipos de *C. moreletii* Cm I a Cm V se encuentran agrupados en un mismo clado y separados de los haplotipos *C. moreletii* que presentan los individuos identificados como *C. acutus* provenientes de Chacahua y Río Huach.

La reconstrucción con sustituciones no sinónimas (figura 10) muestra la similitud que presentan la mayoría de los haplotipos, esto muestra la baja tasa de sustitución que ocurre en este gen.

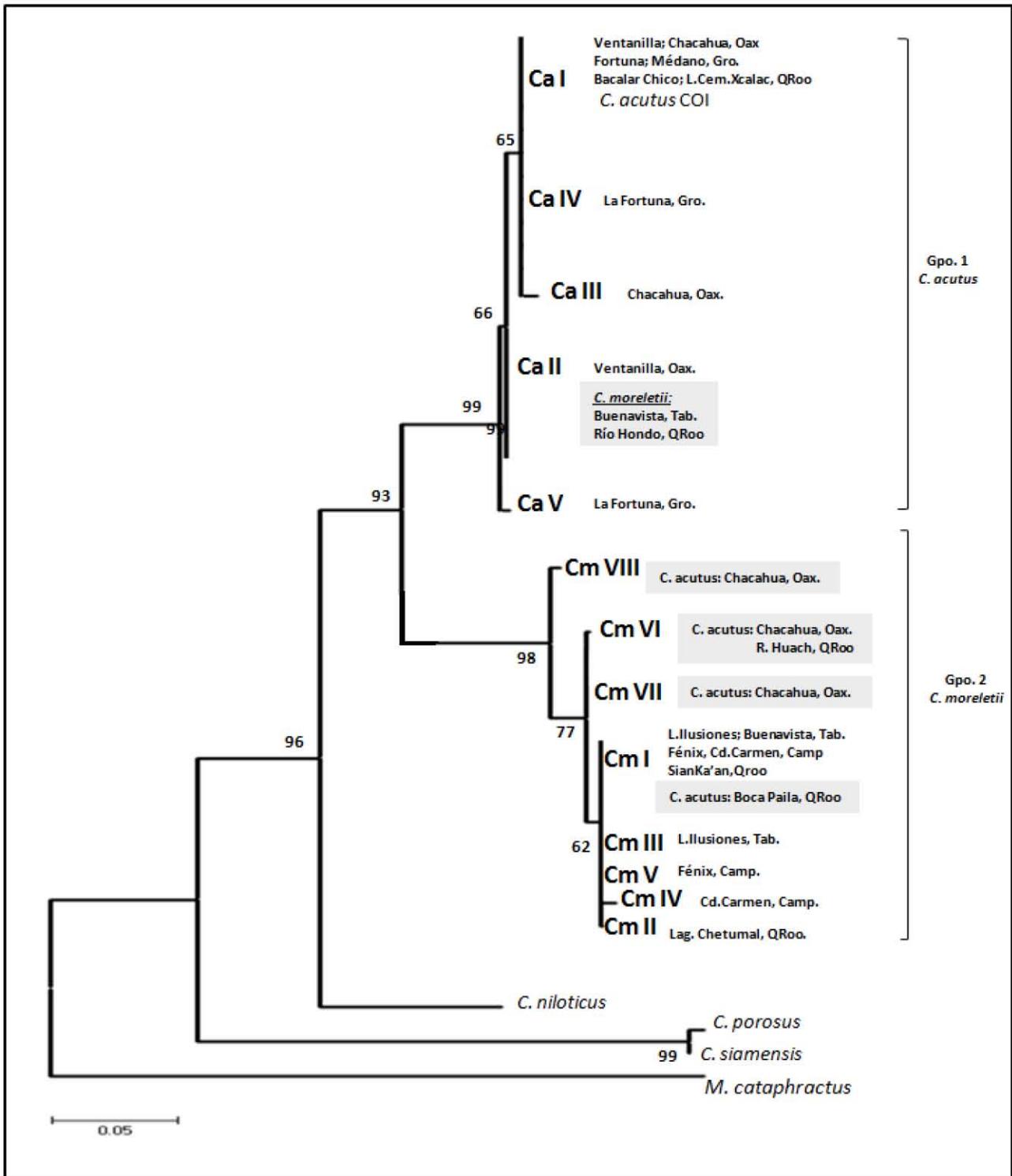


Fig. 8. Árbol construido con Neighbor Jonning, con un Modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta (Transiciones + Transversiones). Los números muestran los valores de bootstrap.

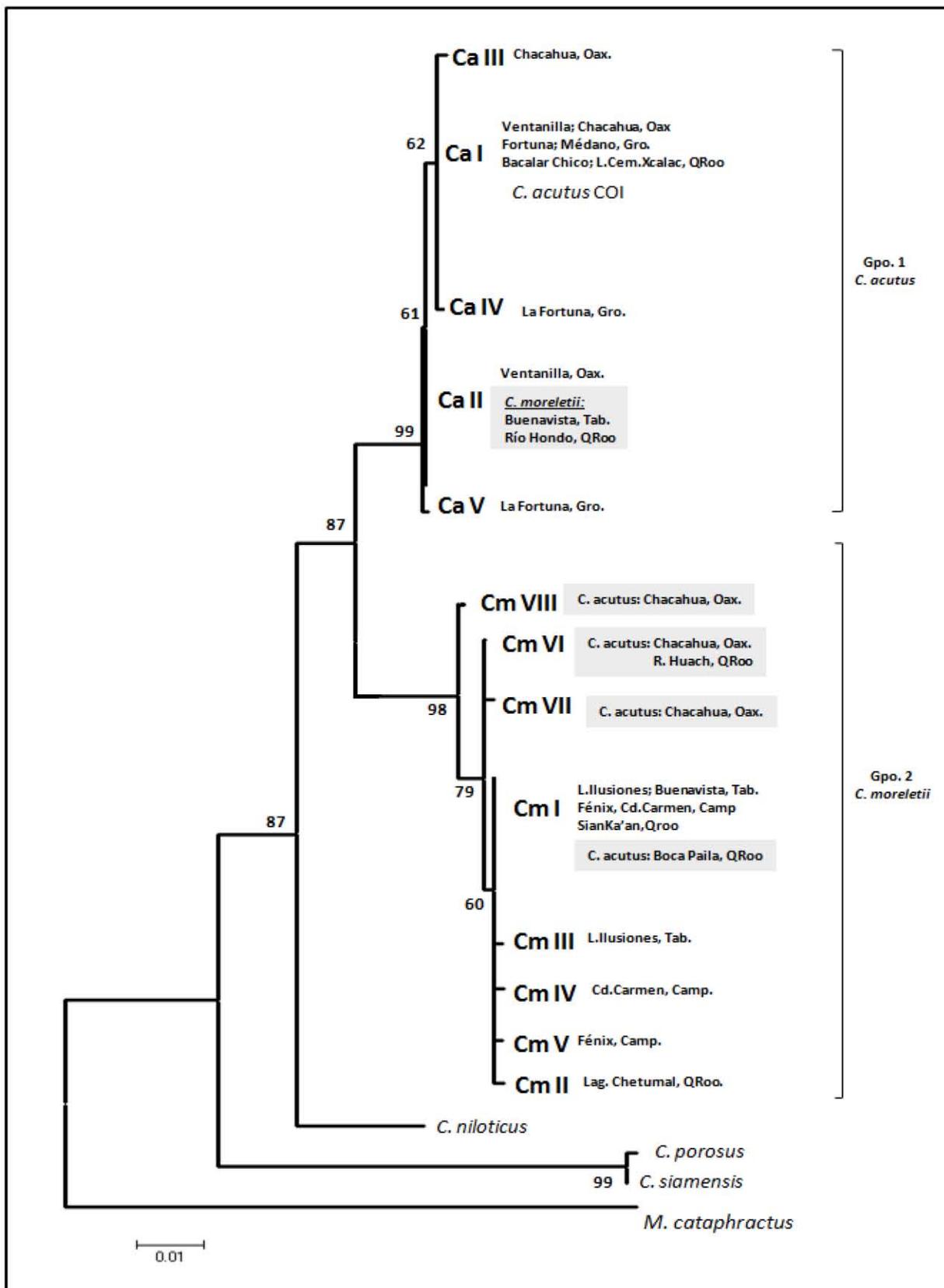


Fig. 9. Árbol construido con Neighbor Joining con un Modelo de Nei-Gojobori (Distancia con sustituciones sinónimas). Los números muestran los valores de bootstrap.

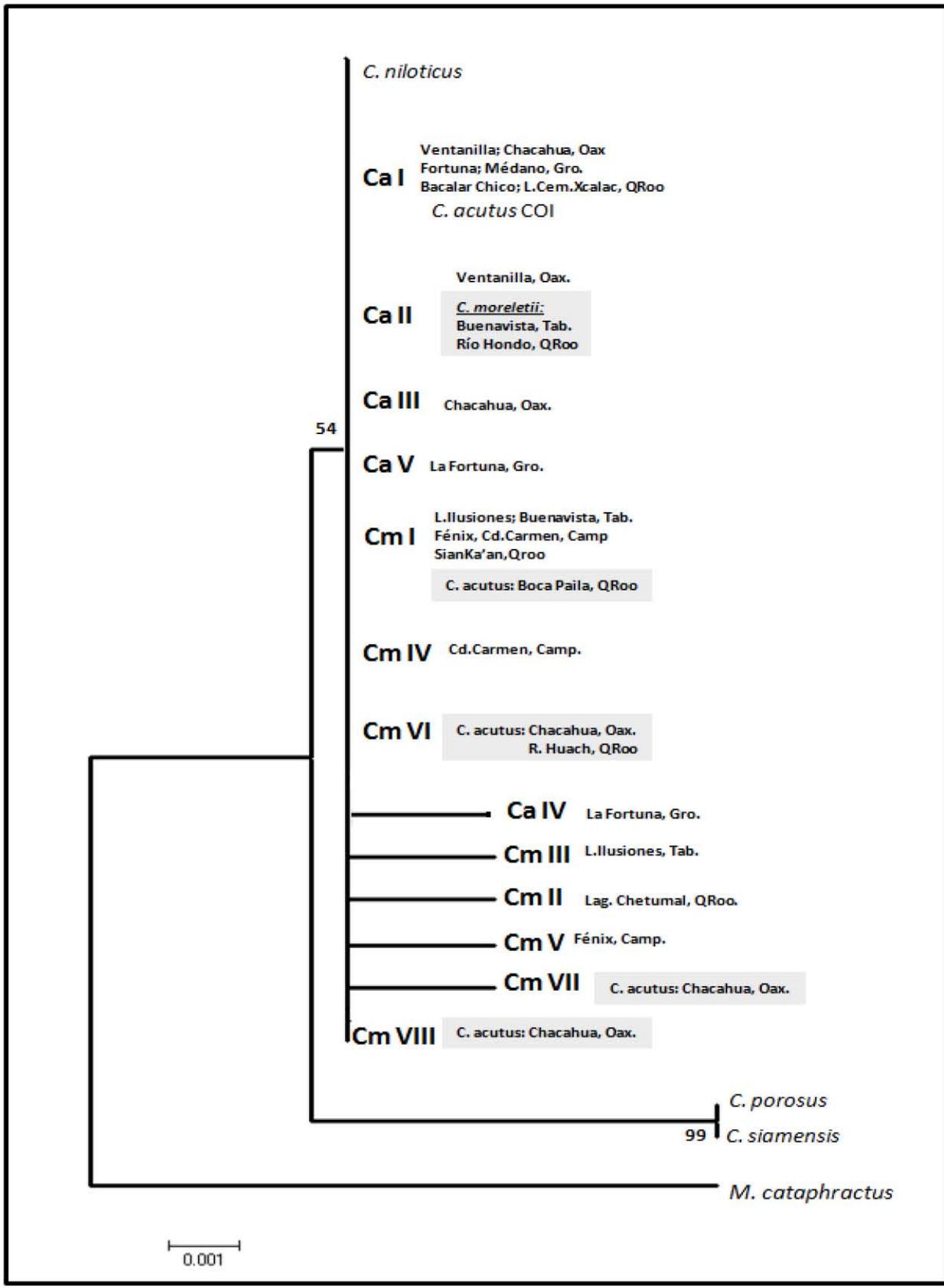


Fig. 10. Árbol construido con Neighbor Joining con un Modelo de Nei-Gojobori (Distancia con sustituciones no sinónimas). Los números muestran los valores de bootstrap.

En el cuadro 11 se muestran los valores de distancias genéticas pareadas calculadas con el método de sustitución Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas y no sinónimas; esto entre las secuencias de seis especies; *Crocodylus niloticus* (GQ144590.1), *C. porosus* (DQ273698.1), *C. siamensis* (DQ353946.1) y *Mecistops cataphractus* (GQ144581.1) que fueron tomadas del GeneBank; las secuencias de *C. acutus* y *C. moreletii* fueron obtenidas del presente trabajo y constituyen los haplotipos más frecuentes encontrados.

De acuerdo con las sustituciones sinónimas, las secuencias de las especies que menos difieren son las de *C. porosus* y *C. siamensis*; seguidos por los valores entre *C. acutus* y *C. moreletii*; los valores comparados entre *C. acutus*, *C. moreletii* y *C. niloticus* muestran un mayor grado de diferenciación. Los valores de las distancias que muestran mayor diferenciación son las comparadas entre *M. cataphractus* y el resto de los individuos pertenecientes al género *Crocodylus*, siendo el valor más alto el que presenta con *C. siamensis*.

Los bajos valores de distancia evaluados con las sustituciones no sinónimas nos muestran que las diferencias que obedecen al cambio en la secuencia de aminoácidos es baja (como pudiera esperarse), pero además nos muestra la mínima diferencia que existe entre especies conocidas como cocodrilos del nuevo mundo (McAliley *et al.*, 2006). Vemos que los haplotipos más comunes de *C. acutus* y *C. moreletii* (encontrados en el presente trabajo) no presentan cambios significativos; lo mismo ocurre entre la secuencia de *C. niloticus* comparada con las anteriores; esta baja diferencia también ocurre entre *C. porosus* y *C. siamensis*. Las secuencias que presentan cierto grado de diferencia (0.006) son las comparadas entre *C. niloticus*, *C. porosus* y *C. siamensis* y entre *C. siamensis*, *C. acutus* y *C. moreletii*. Los valores más altos de diferenciación ocurren entre *M. cataphractus* y el resto de las especies del género.

Cuadro 11. Distancias pareadas entre secuencias de seis especies de cocodrilos, calculadas con el método Nei-Gojobori (1986)

	<i>C. niloticus</i>	<i>C. porosus</i>	<i>C. siamensis</i>	<i>M. cataphractus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. moreletii</i>
<i>C. niloticus</i>		0.319 [0.038]	0.313 [0.038]	0.448 [0.045]	0.154 [0.027]	0.154 [0.027]
<i>C. porosus</i>	0.006 [0.003]		0.006 [0.006]	0.517 [0.044]	0.351 [0.041]	0.308 [0.037]
<i>C. siamensis</i>	0.006 [0.003]	0.000 [0.000]		0.523 [0.045]	0.345 [0.040]	0.302 [0.037]
<i>Mecistops Cataphractus</i>	0.013 [0.005]	0.018 [0.006]	0.018 [0.006]		0.431 [0.040]	0.480 [0.044]
<i>C. acutus</i>	0.000 [0.000]	0.006 [0.003]	0.006 [0.003]	0.013 [0.005]		0.130 [0.027]
<i>C. moreletii</i>	0.000 [0.000]	0.006 [0.003]	0.006 [0.003]	0.013 [0.005]	0.000 [0.000]	

Distancias con sustituciones Sinónimas arriba de la diagonal y con sustituciones No Sinónimas abajo de la diagonal (en paréntesis el error estándar)

4.4. Estructura Genética

Los valores de distancias genéticas mostraron valores más altos de diferenciación entre los grupos que se formaron cuando se usó el modelo de distancia para agrupar a los haplotipos por similitud (0.127 ± 0.026), es decir, con los haplotipos agrupados de acuerdo a los resultados obtenidos con las reconstrucciones filogenéticas; mientras que cuando estos se agruparon de acuerdo con su clasificación morfológica, los valores de diferenciación fueron menores (0.092 ± 0.018), (cuadro 12). Esto muestra que cuando se toman en cuenta a los individuos híbridos dentro de los análisis de diferenciación, estos tienden a homogenizar las diferencias entre las dos especies.

Cuadro 12. Distancias Genéticas entre las secuencias agrupadas filogenéticamente (Gpo. 1 vs Gpo. 2) y entre las secuencias reconocidas morfológicamente como individuos *C. acutus* y *C. moreletii*

	<i>Grupo 1 (C.mor)</i>	<i>C. moreletii</i>	
<i>Grupo 2 (C. acu)</i>	0.127 [0.026]	<i>C. acutus</i>	0.092 [0.018]

Error estándar entre paréntesis

Los valores de distancias genéticas entre las localidades evaluadas de *C. acutus* muestran mayor diferenciación entre las secuencias pertenecientes a Quintana Roo y el resto de las localidades; seguidos por los valores que presentan Chacahua con el resto de las localidades. Los valores entre Ventanilla, La Fortuna y El Médano son bajos (cuadro 13, arriba de la diagonal), indicando poca diferenciación entre ellas.

Los valores altos de distancia genética entre Quintana Roo, Chacahua y el resto de las localidades pueden deberse a la presencia de haplotipos atípicos en las dos primeras; por ello se realizó el análisis de distancias genéticas entre todas localidades descartando dichos haplotipos atípicos (cuadro 13 abajo de la diagonal).

Al descartar los haplotipos atípicos, los valores de distancias genéticas entre Quintana Roo, Chacahua, y el resto de las localidades fueron más bajos, cercanos a cero; lo que muestra que hay poca diferenciación entre los individuos recolectados en dichas localidades.

Cuadro 13. Distancias genéticas entre las localidades de *C. acutus*, calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas

<u>C. acutus</u>	Ventanilla, Oax.	Chacahua, Oax.	La Fortuna, Gro.	El Médano, Gro.	Quintana Roo
Ventanilla, Oax.		0.046 [0.011]	0.004 [0.003]	0.003 [0.003]	0.003 [0.010]
Chacahua, Oax.	0.004 [0.003]		0.046 [0.010]	0.046 [0.010]	0.065 [0.014]
La Fortuna, Gro.	0.004 [0.003]	0.003 [0.002]		0.002 [0.001]	0.063 [0.014]
El Médano, Gro.	0.003 [0.003]	0.001 [0.001]	0.002 [0.001]		0.063 [0.014]
Quintana Roo	0.003 [0.010]	0.001 [0.001]	0.002 [0.001]	0.000 [0.000]	

Distancias genéticas incluyendo todas las secuencias, arriba de la diagonal y con secuencias descartadas abajo de la diagonal (en paréntesis el error estándar)

En las cuatro localidades muestreadas de *C. moreletii*, la localidad con el valor más alto de diferenciación es Buenavista comparada con el resto (cuadro 14, arriba de la diagonal); sin embargo este resultado puede estar influenciado porque dos de las tres secuencias muestreadas de dicha localidad presentaron haplotipos atípicos, propios de *C. acutus*. Lo mismo sucede con una de las tres secuencias muestreadas pertenecientes a Quintana Roo. Es por ello que también se realizó un segundo análisis de distancias genéticas descartando las tres secuencias mencionadas (Cuadro 14, abajo de la diagonal).

Al descartar las secuencias de Buenavista y Quintana Roo, los valores de diversidad genética se encuentran muy cercanos a cero; es decir, que existe poca diferenciación entre las localidades muestreadas de *C. moreletii*.

Cuadro 14. Distancias genéticas entre las poblaciones de *C. moreletii*, calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas

<u>C. moreletii</u>	Lag. Ilusiones, Tab.	Buenavista, Tab.	Campeche	Quintana Roo
Lag. Ilusiones, Tab		0.082 [0.017]	0.001 [0.001]	0.041 [0.009]
Buenavista, Tab.	0.000 [0.000]		0.084 [0.017]	0.069 [0.014]
Campeche	0.001 [0.001]	0.001 [0.001]		0.042 [0.009]
Quintana Roo	0.000 [0.000]	0.000 [0.000]	0.001 [0.001]	

Distancias genéticas incluyendo todas las secuencias, arriba de la diagonal y con secuencias descartadas abajo de la diagonal (en paréntesis el error estándar)

Distancia dentro de Localidades

Las distancias genéticas dentro de las localidades de *C. acutus* muestran a Chacahua y Quintana Roo como las más diferenciadas (cuadro 15); sin embargo, cuando son descartados los individuos con haplotipos atípicos, estas distancias disminuyen; de manera tal que la diferenciación dentro de las localidades es igual a cero. Las distancias dentro de Ventanilla, La Fortuna y El Médano también son bajas, indicando la poca diferenciación que hay dentro de cada localidad.

La distancia dentro de las localidades de *C. moreletii* también fueron bajas; y una vez que se descartó al individuo con haplotipo atípico perteneciente a Quintana Roo la distancia dentro de la localidad también disminuyó (Cuadro 15).

Cuadro 15. Distancia dentro de las localidades de cada especie, calculadas con el método Nei-Gojobori (1986) con sustituciones sinónimas

Especie / Localidad	Ds dentro de las localidades	Ds dentro de las localidades, con secuencias descartadas
<i>C. acutus</i>		
Ventanilla, Oaxaca	0.004 [0.004]	
Chacahua, Oaxaca	0.067 [0.014]	<u>0.002</u> [0.002]
La Fortuna, Gro.	0.004 [0.002]	
Médano, Gro.	0.000 [0.000]	
Quintana Roo	0.086 [0.018]	<u>0.000</u> [0.000]
<i>C. moreeletii</i>		
Lag. De las Ilusiones, Tab.	0.000 [0.000]	
Buenavista, Tab.	0.082 [0.018]	-
Campeche (Cd. Carmen, El Fénix)	0.002 [0.002]	
Quintana Roo	0.082 [0.018]	<u>0.000</u> [0.000]
Error estándar ente paréntesis		

Divergencia entre Poblaciones

Al igual que para los valores de distancias genéticas, los valores de divergencia genética (cuadro 16, arriba de la diagonal) mostraron el mismo comportamiento. Los valores más altos corresponden a las localidades de Chacahua y Quintana Roo con el resto de las localidades. Por ello, se realizó un segundo análisis descartando a los individuos con haplotipos atípicos (cuadro 16, abajo de la diagonal). Al descartar dichas secuencias, los valores de divergencia genética disminuyen de tal manera que son cercanos a cero, los valores que presentan el resto de las localidades (cuadro 16, abajo de la diagonal) muestran poca diferenciación entre ellas.

Los valores de divergencia para las localidades de *C. moreletii* presentan valores altos para las localidades de Buenavista y Quintana Roo con el resto de las localidades (cuadro 17, arriba de la diagonal). Por lo que se realizó un segundo análisis descartando las secuencias que se agruparon con haplotipos de *C. acutus* (cuadro 17, abajo de la diagonal).

Los valores de divergencia al descartar dichas secuencias disminuyen, mostrando mayor diferenciación entre los individuos pertenecientes a Quintana Roo y Laguna de las Ilusiones y entre Quintana Roo y Campeche; aún así los valores son cercanos a cero (cuadro 17, abajo de la diagonal).

Cuadro 16. Divergencia genética (D_{xy}) para las localidades de *C. acutus*

	Ventanilla, Oax.	Chacahua, Oax.	La Fortuna, Gro.	El Médano, Gro.	Quintana Roo
Ventanilla, Oax.		0.0122 [0.0072]	0.0015 [0.0007]	0.0008 [0.0007]	0.0163 [0.0115]
Chacahua, Oax.	0.0011 [0.0007]		0.0125 [0.0071]	0.0119 [0.0085]	0.0168 [0.0082]
La Fortuna, Gro.	0.0015 [0.0007]	0.0012 [0.0007]		0.0009 [0.0007]	0.0168 [0.0112]
El Médano, Gro.	0.0008 [0.0007]	0.0003 [0.0003]	0.0009 [0.0007]		0.0164 [0.0139]
Quintana Roo	0.0008 [0.0007]	0.0003 [0.0003]	0.0009 [0.0007]	0.0000 [0.000]	

Divergencia genética como la media del número de sustituciones nucleotídicas, D_{xy} . Con todas los individuos (arriba de la diagonal) y descartando a los individuos con haplotipos atípicos (abajo de la diagonal); entre paréntesis el error estándar.

Cuadro 17. Divergencia genética (D_{xy}) para las localidades de *C. moreletii*

	Lag. Ilusiones, Tab.	Buenavista, Tab.	Campeche	Quintana Roo
Lag. Ilusiones, Tab		0.0216 [0.016]	0.0008 [0.001]	0.0115 [0.012]
Buenavista, Tab.	0.0003 [0.001]		0.0218 [0.015]	0.0183 [0.013]
Campeche	0.0008 [0.001]	0.0005 [0.001]		0.0117 [0.012]
Quintana Roo	0.0011 [0.001]	0.0008 [0.001]	0.0013 [0.001]	

Divergencia genética como la media del número de sustituciones nucleotídicas, D_{xy} . Con todas los individuos (arriba de la diagonal) y descartando a los individuos con haplotipos atípicos (abajo de la diagonal); entre paréntesis el error estándar.

Los valores de F_{ST} muestran el mismo comportamiento que el resto de los estadísticos que evalúan estructuración genética. Los valores que presentan Chacahua y Quintana Roo son los más altos con respecto a los valores entre el resto de las localidades (cuadro 18); sin embargo, al descartar a los individuos con haplotipos atípicos, estos valores disminuyen de tal manera, que muestran poca diferenciación entre Chacahua y Quintana Roo con el resto de las localidades; siendo los valores de Ventanilla los más altos, comparada con las demás localidades, mostrando mayor diferenciación entre ellas (cuadro 19). Los valores de N_m muestran al menos un migrante entre las localidades muestreadas y estos valores aumentan cuando los individuos con haplotipos atípicos son descartados (cuadro 19).

A diferencia de los valores de F_{ST} de las localidades de *C. acutus*; los valores de F_{ST} pareados para *C. moreletii* (Cuadro 20) muestran poca o ninguna diferenciación y los estimados de migración (N_m) sugieren movimiento de individuos entre las localidades.

Estos bajos valores de F_{ST} ocurren aún cuando son tomados en cuenta los haplotipos atípicos; una excepción, son los valores de Buenavista con Laguna de las Ilusiones y Campeche, en donde dos de los tres individuos evaluados de Buenavista presentan haplotipos típicos de *C. acutus*, debido a que el análisis es imposible de realizar con una sola muestra los valores comparativos entre estas localidades son más altos.

Cuadro 18. Valores del índice de diferenciación F_{ST} para localidades de *C. acutus*

	Ventanilla, Oax.	Chacahua, Oax.	La Fortuna, Gro.	El Médano, Gro.	Quintana Roo
Ventanilla, Oax.		1.72	6.00	1.00	1.21
Chacahua, Oax.	0.2256		1.73	1.44	-3.24
La Fortuna, Gro.	0.0769	0.2243		5.50	1.20
El Médano, Gro.	0.3333	0.2572	0.0833		1.04
Quintana Roo	0.2927	-0.1823	0.2938	0.3252	

Valores de F_{ST} abajo de la diagonal y valores de flujo génico (Nm) arriba de la diagonal

Cuadro 19. Valores de F_{ST} para localidades de *C. acutus*, descartando haplotipos atípicos

	Ventanilla, Oax.	Chacahua, Oax.	La Fortuna, Gro.	El Médano, Gro.	Quintana Roo
Ventanilla, Oax.		1.60	6.00	1.00	1.00
Chacahua, Oax.	0.2381		7.60	∞	∞
La Fortuna, Gro.	0.0769	0.0617		5.50	5.50
El Médano, Gro.	0.3333	0.0000	0.0833		-
Quintana Roo	0.3333	0.0000	0.0833	-	

Valores de F_{ST} abajo de la diagonal y valores de flujo génico (Nm) arriba de la diagonal

Cuadro 20. Valores de F_{ST} para localidades de *C. moreletii*

	Lag. Ilusiones, Tab.	BuenaVista, Tab.	Campeche	Quintana Roo
Lag. Ilusiones, Tab.		0.52	∞	∞
BuenaVista, Tab.	0.4926		0.53	-3.08
Campeche	0.0000	0.4878		∞
Quintana Roo	0.0000	-0.1942	0.0000	

Valores de F_{ST} abajo de la diagonal y valores de flujo génico (Nm) arriba de la diagonal

Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

El AMOVA se evaluó tomando en cuenta a todos los individuos recolectados para ambas especies y en un segundo análisis descartando aquéllos individuos que presentaron haplotipos atípicos.

Para las localidades de *C. acutus* (cuadro 21) el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de cada localidad, cuando se tomaron en cuenta todos los individuos y cuando se descartaron los individuos con haplotipos atípicos (85.68 % y 94.12 %, respectivamente).

El índice de diferenciación fue bajo en ambos casos (0.143 y 0.058), lo cual indica que las localidades muestreadas para individuos de *C. acutus* se encuentran poco diferenciadas; sin embargo, el índice de diferenciación no es significativo en ninguno de los dos casos.

Para las localidades de *C. moreletii* (cuadro 22), el AMOVA muestra que el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de cada localidad (63.09%), pero cuando se descartaron a los individuos con haplotipos atípicos este porcentaje se eleva significativamente (105.44 %). El índice de diferenciación (0.369) disminuye cuando se descartan los individuos con haplotipos atípicos de tal manera (-0.054) que nos muestra que las localidades colectadas no se encuentran diferenciadas significativamente y que los individuos híbridos aportan una falsa diferenciación genética entre localidades.

Además se realizó un AMOVA tomando en cuenta las localidades de ambas especies (cuadro 23). Cuando se toman en cuenta todos los individuos, el mayor porcentaje de variación se encuentra entre los grupos formados (53.75%) y con un índice de fijación alto ($\Phi_{CT} = 0.537$), lo que indica alta estructuración entre los grupos, lo cual es lógico, ya que se trata de un agrupamiento entre individuos de especies diferentes.

El 35.98% de la variación se encuentra dentro de cada localidad, presentando también una alta estructuración ($\Phi_{ST} = 0.537$). Cuando los individuos híbridos son descartados, el 97.36% de la variación ocurre entre las localidades de cada especie (entre grupos), seguido de la variación dentro de cada localidad (2.58%), mientras que el menor porcentaje de la variación se encuentra entre las localidades dentro de los grupos (0.06%). Los índices de fijación son altos entre las localidades de cada especie y dentro de cada localidad, 0.973 y 0.974 respectivamente; estos resultados son significativos y nos muestran que el mayor porcentaje de la variación ocurre dentro de cada localidad.

Cuadro 21. AMOVA en las localidades de *C. acutus*

Todos los individuos					Individuos híbridos descartados			
Fuente de variación	Comp. Variación	% Variación	Estadístico Φ	Sig. (P)	Comp. Variación	% Variación	Estadístico Φ	Sig. (P)
Entre localidades	0.515	14.32			0.017	5.88		
Dentro de localidades	3.084	85.68	$\Phi_{ST} = 0.143$	0.096	0.275	94.12	$\Phi_{ST} = 0.058$	0.191

Cuadro 22. AMOVA en las localidades de *C. moreletii*

Todos los individuos					Individuos híbridos descartados			
Fuente de variación	Comp. Variación	% Variación	Estadístico Φ	Sig. (P)	Comp. Variación	% Variación	Estadístico Φ	Sig. (P)
Entre localidades	1.379	36.91			-0.015	-5.44		
Dentro de localidades	2.357	63.09	$\Phi_{ST} = 0.369$	0.027	0.297	105.44	$\Phi_{ST} = -0.054$	0.603

Cuadro 23. AMOVA entre las localidades de *C. acutus* y *C. moreletii*

Todos los individuos					Individuos híbridos descartados			
Fuente de variación	Comp. Variación	% Variación	Estadístico Φ	Sig. (P)	Comp. Variación n	% Variación n	Estadístico Φ	Sig. (P)
Entre grupos	4.226	53.75	$\Phi_{CT} = 0.537$	0.017	10.668	97.36	$\Phi_{CT} = 0.973$	0.006
Entre pob. dentro de los grupos	0.807	10.27	$\Phi_{SC} = 0.222$	0.110	0.006	0.06	$\Phi_{SC} = 0.022$	0.367
Dentro de poblaciones	2.828	35.98	$\Phi_{ST} = 0.537$	0.000	0.283	2.58	$\Phi_{ST} = 0.974$	0.000

Porcentaje de la variación distribuido en niveles jerárquicos

V. Discusión

La destrucción del hábitat, la caza ilegal y el aprovechamiento no sustentable de los cocodrilianos ha despertado el interés de aportar nueva información de tipo poblacional con el fin de llevar a cabo de manera eficiente programas de manejo sustentable y de conservación de las poblaciones de cocodrilianos en el mundo con el fin de disminuir la pérdida de biodiversidad (Casas 1995, Ross 1998, Dever *et al.* 2002, Ray *et al.* 2004, Sánchez-Vilchis 2007). Con este fin se ha generado información a cerca de la diversidad genética de diferentes especies de cocodrilos (Glenn *et al.* 2002, Hekkala 2004, Barban-Zucoloto *et al.* 2006), incluyendo especies mexicanas (Dever *et al.* 2002, Ponce-Campos y Dubach 2004, Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Sánchez-Vilchis 2007; Cedeño-Vázquez *et al.* 2008, Machkour *et al.* 2009, Serrano-Gómez 2010).

El análisis de sitios polimórficos de las secuencias obtenidas para ambas especies evidenciaron hibridación, individuos caracterizados fenotípicamente como *Crocodylus acutus* pero con haplotipos propios de *C. moreletii* e individuos caracterizados fenotípicamente como *C. moreletii* pero con haplotipos propios de *C. acutus*. Este patrón de agrupamiento ya se ha evidenciado en estas especies, a lo largo de su rango de distribución (Dever *et al.* 2002, Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Rodríguez *et al.* 2008, Cedeño-Vázquez *et al.* 2008 y Serrano-Gómez 2010).

Debido a que con el agrupamiento de haplotipos atípicos en cada especie se pueden sobreestimar los estadísticos de diversidad y de estructuración genética, estos se realizaron tomando en cuenta primero a todos los individuos caracterizados morfológicamente como una u otra especie y en un segundo análisis se descartaron todos aquellos individuos con haplotipos atípicos. Sin embargo, al descartar dichos individuos se reduce el tamaño de muestra considerablemente; tal es el caso de la localidad de Chacahua, Oaxaca; en la que se contaba con 8 individuos identificados como *C. acutus* y se descartaron 3 con haplotipos atípicos y propios de *C. moreletii*; para Quintana Roo la muestra se redujo a 2 individuos. En la localidad de Buenavista se descartaron 2 individuos identificados como *C. moreletii* pero que presentaron haplotipos atípicos y propios de *C. acutus*, reduciendo el tamaño de muestra a 1 y para Quintana Roo la muestra se redujo a 2 individuos.

Es importante tomar en cuenta este bajo tamaño de muestra, ya que debido a esta no es posible hacer suposiciones de tipo poblacional, sólo referirse a los individuos de las localidades muestreadas.

5.1. Diversidad Genética

Los valores de diversidad genética obtenidos por medio del gen COI son valores similares a los obtenidos por medio de la región control (Glenn *et al.* 2002, Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Sánchez-Vilchis 2007, Cedeño-Vázquez 2008), los cuales han sido citados como valores bajos. La diversidad haplotípica para *Crocodylus acutus* fue de 0.632 (± 0.1030) y para *C. moreletii* de 0.647 (± 0.1200), sin embargo estos valores disminuyen a 0.455 (± 0.1230) para *C. acutus* y a 0.505 (± 0.158) para *C. moreletii* cuando se descartan a los individuos con haplotipos atípicos para cada especie; estos índices de diversidad haplotípica son similares a los registrados por Ray *et al.* (2004), ellos encontraron valores de 0.251 para *C. moreletii* y Rodríguez (2007) encontró 0.518 para *C. acutus*; estos y otros estudios que han aportado información a cerca de la diversidad genética de estas especies se resumen en la cuadro 24.

La baja diversidad genética encontrada con marcadores mitocondriales puede obedecer a la baja tasa de mutación que estos presentan por ser genes conservados; Ray *et al.* (2004) calcularon una tasa de sustitución nucleotídica de 1.66×10^{-8} ; según Cedeño-Vázquez (2008) 3.6 veces más baja que la tasa estándar para los mamíferos calculada por Brown *et al.* (1982) de 5.9×10^{-8} . Además, el hecho de que las secuencias evaluadas en este trabajo no se encuentran sujetas a selección (pruebas de neutralidad) y que las diferencias entre las sustituciones nucleotídicas no sinónimas son bajas, apoya el hecho de que la variación en este gen (y en genes mitocondriales) es más baja en comparación con marcadores nucleares como los microsatélites; ejemplo de esto es el trabajo de Glenn *et al.* (1998), quienes encontraron altos niveles de heterocigosidad (0.47) y alta diferenciación entre las poblaciones de *Alligator mississippiensis* en Florida; valores muy similares de heterocigosidad (0.49) encuentra Dever *et al.* (2002) en poblaciones de *Crocodylus moreletii* en Belice; por ello el patrón altamente polimórfico de los marcadores nucleares es capaz de detectar mayor polimorfismo en las poblaciones de cocodrilos.

Los patrones de baja variación genética en genes mitocondriales encontrados en poblaciones de cocodrilos se han intentado explicar como resultado de selección direccional, que favorece a un fenotipo en respuesta a largos periodos de estabilidad ambiental (Flint *et al.* 2000) y debido a su adaptación a ambientes acuáticos relativamente poco cambiantes (Lawson *et al.* 1989); los cocodrilos se han mantenido sin grandes cambios a lo largo de su historia evolutiva en la Tierra, causando así una baja tasa de mutación en genes conservados (Field *et al.* 1988, Li y Graur 2000, Sánchez-Vilchis 2007).

Cuadro 24. Valores de diversidad genética para *C. acutus* y *C. moreletii* generados por medio de ADNmt en otros estudios

Espece	Localidad evaluada	Gen mitocondrial	N	No. Haplotipos	Valores de diversidad	Referencia
<i>C. moreletii</i>	Belice	Región control, DNAm	140	20	$h = 0.251$ (± 0.055) $\pi = 0.00072$ (± 0.00073)	Ray <i>et al.</i> (2004)
<i>C. acutus</i>	Florida	Genes parciales mitocondriales (ND4- tRNAHis- tRNASer) y región control	48	6	$h = 0.5180$ (± 0.05150) $\pi = 0.0012$ (± 0.00109)	Rodríguez (2007)
<i>C. acutus</i>	Su rango de distribución, excepto Península de Yucatán	Región control	35	2	$h = 0.1079$ (± 0.0680) $\pi = 0.0002$ (± 0.00037)	Sánchez-Vilchis, 2007
<i>C. moreletii</i>	Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Colima	Región control	24	3	$h = 0.4094$ (± 0.1035) $\pi = 0.00208$ (± 0.0015)	Sánchez-Vilchis, 2007
<i>C. acutus</i>	Península de Yucatán	tRNAProt, tRNAPhe- y Dloop	43	3	$h = 0.6722$ (± 0.0229) $\pi = 0.0017$ (± 0.0014)	Cedeño-Vázquez <i>et al.</i> , 2008
<i>C. moreletii</i>	Península de Yucatán	tRNAProt, tRNAPhe- y Dloop	56	4	$h = 0.3617$ (± 0.0728) $\pi = 0.0020$ (± 0.0015)	Cedeño-Vázquez <i>et al.</i> , 2008
<i>C. acutus</i>	Costa de Oaxaca	Región Control	16	3	$h = 0.684$ (± 0.0103) $\pi = 0.00118$ (± 0.00034)	Serrano-Gómez, 2010
<i>C. acutus</i>	Oaxaca, Guerrero, Q. Roo	Gen COI	28	5	$h = 0.455$ (± 0.123) $\pi = 0.0009$ (± 0.0002)	Este trabajo (2011)
<i>C. moreletii</i>	Tabasco, Campeche, Q. Roo	Gen COI	17	5	$h = 0.505$ (± 0.158) $\pi = 0.0009$ (± 0.0003)	Este trabajo (2011)

Diversidad Haplotípica (h), Diversidad Nucleotídica (π) y error estándar (\pm e.s.).
El número de haplotipos corresponden a los haplotipos reportados como puros.

En los estudios de distribución mismatch realizados (Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007, Rodríguez *et al.* 2008) no se han encontrado cuellos de botella recientes en las poblaciones de cocodrilos estudiadas e incluso registran patrones de estabilidad en el tamaño poblacional (Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007). Estos resultados contradicen la historia de aprovechamiento desmedido que se ha hecho de estas especies, pues se sabe que las actividades de caza a gran escala menguaron peligrosamente las poblaciones durante las décadas de los 60's y 70's (Casas-Andreu 1995, 2010) y aunque se cree que las poblaciones han comenzado a recuperarse al establecer programas de protección y aprovechamiento sustentable (Platt 1996, Platt y Thorbjarnarson 2000b, Cedeño-Vázquez *et al.* 2006, Casas y Aguilar 2007), esta historia debería poder documentarse a través de la genealogía de los marcadores moleculares nucleares que hasta ahora se han evaluado. Por lo que se cree que otros factores han estado influenciando en el aumento de la variación genética de dichas poblaciones.

Rodríguez (2007) atribuye el incremento de la diversidad no propiamente al aumento en el tamaño poblacional, sino al aporte de alelos nuevos provenientes de individuos externos; ya que él encuentra en poblaciones de *Crocodylus acutus* en Florida haplotipos compartidos con México (Caribe), Jamaica y Costa Rica.

Otro factor que pudiera influir en el poco reconocimiento de los cuellos de botella por los que las poblaciones de cocodrilos han pasado y que los estudios al respecto aún son escasos; son los sistemas de reproducción poliándricos, en los que las hembras se aparean con varios machos y puede haber almacenamiento de esperma con lo que puede ocurrir múltiple paternidad. Se sabe que la múltiple paternidad puede resultar en un incremento en el tamaño efectivo de la población (Zane *et al.* 1999, Sugg y Chesser 1994), lo que permite la retención de variación genética en poblaciones expuestas a fuertes fluctuaciones en su abundancia; además, altas tasas de múltiple paternidad pueden aportar nuevos alelos a la población por migración; disminuyendo así la homogenización resultado de la pérdida de variación genética por deriva génica (Mamuris *et al.* 2005, Calsbeek *et al.* 2007).

A la fecha sólo se ha registrado esta estrategia de reproducción en vida libre y múltiple paternidad en *Alligator mississippiensis* (Davis *et al.* 2001) y en nidos de *C. moreletii* en dos localidades de Belice (New River Lagoon y Gold Button Lagoon) (McVay *et al.* 2008); en las cuales detectan que al menos en la mitad de los nidos evaluados existen alelos aportados por dos machos diferentes.

El generar estudios de diversidad genética en estas especies a través de marcadores moleculares nucleares altamente polimórficos podría evaluar de una manera más fina el nivel de diversidad genética y así conocer si existe un aporte de nuevos alelos a las poblaciones de cocodrilos; además de resultar útiles en evidenciar si existe múltiple paternidad en una nidada.

5.2. Relaciones de similitud

Las distancias entre secuencias de diferentes especies de cocodrilos nos muestra la baja sustitución nucleotídica que ocurre en genes conservados, sobre todo en la tasa de sustituciones no sinónimas, en donde vemos que existe muy poca diferenciación entre especies. Sin embargo, esta baja diferenciación nos provee de información con la que podemos inferir relaciones filogenéticas antiguas (Folmer *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2003; Remigio y Hebert, 2003).

Las distancias pareadas entre las secuencias de las seis diferentes especies muestran la baja diferenciación que existe en este gen entre los miembros del género *Crocodylus*, catalogados como cocodrilos del nuevo mundo (McAliley *et al.*, 2006); *C. acutus* y *C. moreletii* pertenecen a este grupo y presentan valores de distancia con sustituciones sinónimas más bajos en comparación con el resto; y valores iguales a cero cuando se toman en cuenta las sustituciones no sinónimas. La especie más cercana a estas dos, que presenta menor diferencia en este gen es *Crocodylus niloticus*, lo que concuerda con los resultados de McAliley *et al.* (2006), quienes muestran que *C. acutus*, *C. moreletii* y *C. niloticus* son especies muy cercanas y que incluso llegan a encontrarlas como especies hermanas entre sí en algunas de sus reconstrucciones filogenéticas. Otras especies que registran como cercanas a *C. acutus* y *C. moreletii*, son *C. rhombifer*, *C. johnsoni*, *C. intermedius*, *C. mindorensis* y *C. novaeguineae*; y un poco más diferenciadas de estas a *C. siamensis* y *C. porosus* pero siempre agrupadas en un clado superior.

En los árboles contruidos con los diferentes modelos de sustitución se observan siempre a *C. porosus* y *C. siamensis* como especies hermanas; esto también sucede siempre en las reconstrucciones de McAliley *et al.* (2006). *Mecistops cataphractus* aparece como la especie más lejana del resto de las especies evaluadas en el presente trabajo; en el trabajo de McAliley *et al.* (2006) debido a que siempre se mantiene separada del clado del género *Crocodylus* es que deciden excluirla de dicho género y colocarla dentro del género histórico de *Mecistops*.

5.3. Estructura Genética

Cuando se agrupan a los individuos identificados morfológicamente a una u otra especie el valor de la distancia genética es menor (0.092 ± 0.018) que cuando los individuos son agrupados de acuerdo al haplotipo que presentan, propios de una especie u otra (0.127 ± 0.026). Esto nos muestra que el tomar en cuenta a los híbridos dentro de un grupo de individuos pertenecientes a una especie la diferenciación entre las especies tiende a disminuir y por lo tanto a subestimar la estructura poblacional entre las poblaciones de una especie.

Los valores de distancia genética entre las localidades de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* son bajos y muy cercanos a cero, esto muestra la poca diferenciación que es posible identificar con un marcador conservado como el gen COI; aún cuando éstas fueron calculadas con sustituciones sinónimas, con las cuales se suponían mayores cambios nucleotídicos. Los valores de distancia entre las localidades de *C. moreletii* son aún más bajos y más cercanos a cero, lo que nos muestra la poca diferenciación entre los individuos de las localidades muestreadas. Los valores de distancias dentro de las localidades también son cercanos a cero, una vez que son descartados los haplotipos atípicos y la baja diferenciación que se observa dentro de ellas obedece a la variación nucleotídica dentro de cada localidad muestreada. Los resultados obtenidos con los valores de divergencia no difieren mucho de los anteriores.

Debido a la baja variación que presenta este gen y por lo tanto a la baja diferenciación entre las secuencias evaluadas; los patrones de estructuración entre las localidades muestreadas podrían estar en extremo subestimados; esto aunado al bajo tamaño de muestra.

A pesar de ello se obtuvieron valores de diferenciación de F_{ST} ; para las localidades de *C. acutus* que van de 0.083 a 0.00 (sin tomar en cuenta los valores pareados de Ventanilla); y para *C. moreletii* los valores son iguales a cero (sin tomar en cuenta los valores pareados de Buenavista); esto nos indica la baja variación del gen estudiado.

Un caso especial son los valores pareados de F_{ST} para Ventanilla (individuos de *C. acutus*), que se encuentran entre 0.0769 y 0.333; y que muestran cierta diferenciación entre esta y el resto de las localidades; esto puede deberse a que fue la localidad que mayor diversidad haplotípica presentó. El análisis pareado entre Buenavista y el resto de las localidades (individuos *C. moreletii*) fue imposible de realizar, ya que se descartaron dos de los tres individuos pertenecientes a ésta localidad por presentar haplotipos propios de *C. acutus*.

Ya se ha registrado una baja diferenciación en las poblaciones de *Crocodylus moreletii* en Belice (Dever *et al.* 2002, Ray *et al.* 2004) con valores de 0.06 en Ray *et al.* (2004) y valores de diferenciación entre las localidades de 0.333 a 0.481 (Petén y New River) en Belice (Ray *et al.* 2004); en las poblaciones de la Península de Yucatán. Rodríguez *et al.* (2008) encontraron también bajos valores de diferenciación (0.010), sin embargo, Cedeño-Vázquez (2008), en la Península de Yucatán encontró mayor estructuración entre las poblaciones de *C. moreletii* y *C. acutus*, evidenciando poca migración entre éstas.

En cuanto a *C. acutus*, se ha encontrado poca diferenciación entre localidades en las costas de Jalisco (Ponce-Campos *et al.* 2004), aunque para poblaciones de Florida se han encontrado valores más altos de diferenciación ($\Phi_{ST} = 0.211$; $F_{ST} = 0.144$) (Rodríguez 2007), pero similares a los encontrados entre Ventanilla y el resto de las localidades. Entre las localidades evaluadas en la Península de Yucatán, Rodríguez *et al.* (2008) encontraron baja diferenciación (0.061); a diferencia de los encontrados por Cedeño-Vázquez (2008).

Los valores de migración entre las localidades de las dos especies podrían sugerir un aparente movimiento de individuos; sin embargo, debido a la baja variación del gen y a los bajos tamaños de muestra sólo es posible afirmar que los haplotipos del gen COI que comparten las localidades muestreadas no difieren en gran medida entre ellos y que el mayor porcentaje de la variación encontrada se debe a la diferencia nucleotídica de los individuos que habitan en cada localidad muestreada (resultados del AMOVA), es decir; que la variación se distribuye dentro de cada localidad y que no existe diferenciación entre ellas.

Se han encontrado valores de migración relativamente altos en otros trabajos; Rodríguez (2007) estimó (a partir del estadístico F_{ST}) 2.03 individuos migrantes entre las subpoblaciones geográficas de *C. acutus* y 3.76 entre las subpoblaciones de *C. moreletii* en la Península de Yucatán. Y si se toma en cuenta que con un promedio de un individuo migrante por generación en un modelo de islas, es suficiente para hacer que todos los alelos se encuentren en todas las poblaciones (Allendorf y Luikart 2007), es de esperarse la baja estructuración de las poblaciones de cocodrilos evaluadas hasta ahora. Sin embargo, Cedeño-Vázquez (2008) encontró poblaciones más estructuradas, y con índices de migración más bajos, atribuyendo esto a la actividad turística que impera en la zona y que evita que los individuos migren libremente.

En trabajos previos se ha atribuido la diferenciación de las poblaciones de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* a un modelo de migración de aislamiento por distancia (Dever *et al.* 2002, Ray *et al.* 2004, Sánchez-Vilchis 2007, Cedeño-Vázquez 2008), sin embargo; se ha visto que la diferenciación entre localidades puede verse sobreestimada por haplotipos atípicos (Ray *et al.* 2004, Rodríguez 2007) y que incluso en ocasiones no es posible distinguir del todo a individuos híbridos debido a que algunos de ellos presentan caracteres crípticos, por ello las estimaciones de estructuración poblacional pueden encontrarse sobreestimadas (Rodríguez 2007, Rodríguez *et al.* 2008).

A pesar de esto, la baja diferenciación entre los haplotipos encontrados (sin tomar en cuenta haplotipos atípicos) puede deberse al hecho de que se tiene registro de la alta dispersión que presentan estas especies (Dever *et al.* 2002). Se sabe que los individuos de *C. moreletii* se dispersan por tierra de unos cuerpos de agua a otros y que en ocasiones, sucesos meteorológicos como huracanes e inundaciones pueden ser determinantes en su migración a través de cuerpos de agua continentales (Dever *et al.* 2002, Cedeño-Vázquez 2008). Por su parte, se sabe que los individuos de *C. acutus* migran por las costas, soportando altos niveles de salinidad por lo que son capaces de migrar por el océano y abarcar grandes extensiones de territorio (Alvarez del Toro y Sigler 2001, Dessauer *et al.* 2002, Cedeño-Vázquez 2008).

5.4. Hibridación

En el presente trabajo se encontraron individuos híbridos, los identificados morfológicamente como *Crocodylus acutus*, pero con haplotipos propios de *C. moreletii* y los identificados morfológicamente como *C. moreletii*, pero con haplotipos propios de *C. acutus*.

Los individuos híbridos pertenecientes a Quintana Roo coinciden con el área de hibridación que encuentra Rodríguez (2007), Cedeño-Vázquez *et al.* (2008) y Rodríguez *et al.* (2008). Además, se encontraron individuos híbridos en la localidad Lagunas de Chacahua, la misma zona en la que Serrano-Gómez (2010) encuentra hibridación.

Además de coincidir con las zonas de hibridación antes mencionadas, se encontraron nuevos individuos híbridos en una localidad no registrada; dichos individuos provienen de Buenavista, Tabasco. En la figura 11 se muestran las zonas de hibridación encontradas hasta ahora en los estudios ya mencionados y en el presente.

Históricamente, se tienen registros de la hibridación entre estas y otras especies de cocodrilos. En especímenes de museo de *C. acutus* recolectados a lo largo de sus zonas de distribución, Ross y Ross (1974) encontraron grupos de escamas irregulares en la superficie lateral de la cola; esto en individuos que se distribuían en zonas de simpatria con *C. moreletii* en poblaciones de Chiapas y de Belice (Ray *et al.* 2004). Además se han encontrado zonas de hibridación en Cuba entre *C. acutus* y *C. rhombifer* (Ramos *et al.* 1994) y en cautiverio se han registrado cruces entre *C. rhombifer* y *C. siamensis* (FitzSimmons *et al.* 2002); además del informe de las zonas de hibridación en el Caribe mexicano (Cedeño-Vázquez *et al.* 2008, Rodríguez *et al.* 2008) y en poblaciones de *C. moreletii* en Belice (Ray *et al.* 2004). También se han encontrado haplotipos propios de *C. rhombifer* en México y Jamaica, atribuyendo esto a la actividad humana o bien a patrones naturales de migración (Rodríguez 2007).

A pesar de que ahora se sabe que la hibridación entre estos taxones relacionados ha ocurrido históricamente y que las zonas de simpatria entre las especies es un factor determinante para que esta ocurra; la actividad humana ha jugado un papel muy importante en las últimas décadas en la generación de individuos híbridos no sólo en zonas de simpatria (Rodríguez 2007), sino también en las zonas de distribución no originales de las especies (Rodríguez 2007, Serrano-Gómez 2010), debido a la traslocación de individuos principalmente de *C. moreletii* con el fin de crear granjas productoras de pieles y subproductos (Muñiz *et al.* 1997, Sánchez-Vilchis 2007; Serrano-Gómez 2010).

Ese es el caso de los individuos híbridos encontrados en la localidad Lagunas de Chacahua (Muñiz *et al.* 1997, Sánchez-Vilchis 2007, Serrano-Gómez 2010) en el presente trabajo y en el realizado por Serrano-Gómez (2010); estos individuos híbridos fueron morfológicamente identificados como *Crocodylus acutus*, pero presentaron haplotipos propios de *C. moreletii* como lo muestran las redes de haplotipos construidas y la distribución geográfica de los mismos. Sin embargo, a pesar de que presentan haplotipos propios de *C. moreletii*, los haplotipos que presentan estos individuos no son compartidos con ningún otro individuo *C. moreletii* muestreado en este trabajo; por lo que el origen de estos puede remontarse hacia los años de 1975, 1976 y principios de la década de los ochentas, cuando llevaron individuos *C. moreletii* al Parque Nacional Lagunas de Chacahua y con los que se inició la producción en la granja recién construida (Muñiz *et al.* 1997, Cedeño-Vázquez 2008).

Los ejemplares recolectados por Serrano-Gómez (2010) en dicha zona (usados para este estudio) fueron clasificados por tener caracteres fenotípicos propios de *C. acutus*; pero ahora vemos que estos ejemplares provienen de madres o abuelas *C. moreletii* con haplotipos distintos a los encontrados en este trabajo.

Los individuos *C. moreletii* introducidos a Chacahua al parecer eran descendientes de una población de Yucatán, y eso podría explicar el haplotipo *C. moreletii* (Cm VI) compartido entre dos individuos *C. acutus*, uno proveniente de Chacahua y otro de Río Huach, Quintana Roo. El individuo de Río Huach correspondería al RC137 del trabajo de Cedeño (2007), quien lo reporta como un individuo críptico, con fenotipo *C. acutus* y con el haplotipo CmB.

El individuo híbrido con fenotipo *C. acutus* proveniente de Boca Paila (Sian Ka'an, Quintana Roo) presenta el haplotipo *C. moreletii* más común (Cm I) y es posible que corresponda al individuo RC108 que reporta Cedeño-Vázquez (2008) en su trabajo, el cual presentó fenotipo *C. acutus* y el haplotipo CmB de *C. moreletii*. Esta hibridación pudo haber tenido origen en el área de simpatria de las dos especies.

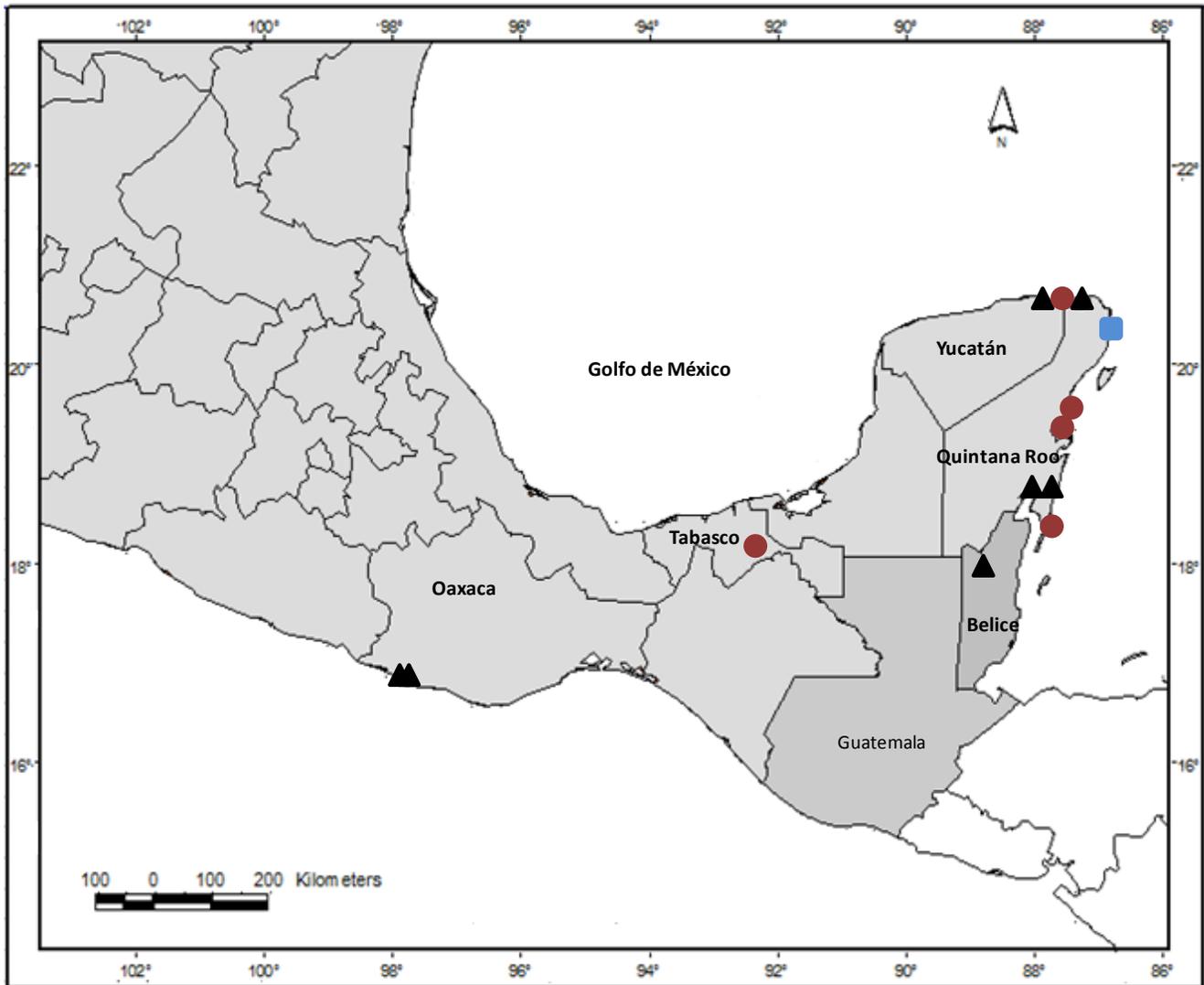


Fig. 11. Zonas registradas con individuos híbridos.

Los triángulos negros corresponden a individuos fenotípicamente *C. acutus* con haplotipos propios de *C. moreletii*.

Los círculos rojos corresponden a individuos fenotípicamente *C. moreletii* pero con haplotipos de *C. acutus*.

El Cuadro azul corresponde al haplotipo *C. rhombifer* encontrado en un individuo fenotípicamente *C. acutus* (Cedeño-Vázquez *et al.*, 2008). La zona de Quintana Roo corresponde a los resultados obtenidos por Cedeño-Vázquez *et al.* (2008) y por el presente trabajo. La zona de Belice corresponde a los resultados obtenidos por Ray *et al.* (2004). La zona de Tabasco (Buenavista) corresponde a resultados obtenidos en el presente trabajo; y la zona de Oaxaca (Chacahua) corresponde a los resultados de Serrano-Gómez (2010) y al presente trabajo. *Nota: Mapa modificado del que presenta Cedeño-Vázquez et al. (2008). Debido a la escala del mapa no es posible corresponder cada punto, pero sí un área determinada.*

Los individuos híbridos provenientes de Buenavista, Tabasco; al momento de colectarlos formaban parte del grupo de hembras reproductoras de la granja Coco Maya, comercializadora de piel y carne. Se sabe que estas hembras han tenido descendencia (individuos destinados al comercio); por lo que esto apoya los análisis de Rodríguez *et al.* (2008); en los cuales muestran que los individuos híbridos agrupados en posiciones intermedias en sus reconstrucciones filogenéticas son individuos F2 o retrocruzas hacia una u otra especie; y que lo importante a recalcar con esto es que los individuos híbridos interespecíficos son viables reproductivamente.

Estos individuos híbridos presentan el haplotipo Ca II distribuido en Ventanilla, Oaxaca; por ello el origen de esta hibridación puede prestarse a muchas especulaciones puesto que estas hembras reproductoras provenientes de Buenavista, Tabasco a su vez son descendientes de individuos reproductores de la granja ubicada en dicha zona; es probable que haya habido alguna introducción de algún individuo hembra *Crocodylus acutus* en dicha granja o bien que la hibridación haya tenido lugar en Tabasco, de donde se sabe provienen los individuos reproductores de Buenavista.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen individuos reproductores híbridos en la granja de Buenavista, Tabasco y en la de Coco Maya, Campeche; es importante tomar en cuenta esto para futuras reintroducciones, pues el tener a los individuos genéticamente identificados se está volviendo una parte importante en la conservación de dichas especies pues el reintroducir animales híbridos es ahora muy probable y hasta ahora no se conocen las implicaciones que esto pueda tener en las poblaciones de vida libre.

El individuo *C. moreletii* proveniente de Río Hondo presenta también el haplotipo Ca II, el hecho de que se encuentre en la zona de hibridación registrada por Cedeño-Vázquez (2008) apoya este resultado; sin embargo, los individuos *C. moreletii* de esta localidad que dicho autor colectó no presentaron haplotipos propios de *C. acutus*. Esta contradicción podría obedecer a que el individuo evaluado en este trabajo no corresponde a ninguno de los que Cedeño-Vázquez (2008) evaluó.

La hibridación puede ser de origen natural o bien puede ser consecuencia de las actividades humanas; se sabe que el movimiento y la traslocación de individuos a zonas de distribución no originales ha sido una de las principales causas que han originado hibridación en especies silvestres, sin embargo; la actividad turística, agrícola e industrial también han jugado un papel importante para que esta se lleve a cabo (Allendorf y Luikart 2007).

Los eventos de hibridación histórica en la Península de Yucatán pudieron haber sido influenciados por la fluctuación en la profundidad de los cuerpos de agua continentales durante la época de lluvia y secas, y por los cambios periódicos en el nivel del mar; lo que resulta en rangos de solapamiento de especies por largos periodos de tiempo (Rodríguez 2007). Estos eventos de hibridación histórica

han ocurrido sin lugar a dudas pero en baja frecuencia; por lo que se cree que la mayoría de los eventos de hibridación encontrados a últimas fechas han ocurrido recientemente y que han sido producto de la actividad humana (Rodríguez 2007, Gonzalez-Porter *et al.* 2011).

En la zona de la Península de Yucatán, la actividad turística pudo haber causado el movimiento de *Crocodylus moreletii* a zonas costeras, invadiendo el rango de distribución de *C. acutus* y dando lugar a la hibridación entre individuos de las dos especies.

La traslocación de individuos a zonas de distribución no originales también ha resultado en procesos de hibridación entre las dos especies; el caso ya mencionado de Lagunas de Chacahua ha sido producto de esta práctica (Cedeño 2007); otro caso, reportado por Sánchez-Vilchis (2007) es el de la Laguna de Alcazahue en Colima, en donde individuos *C. moreletii* fueron introducidos en 1985 con el fin de realizar cría intensiva. Se cree que *C. moreletii* ha desplazado a *C. acutus* localmente; y se han observado individuos *C. acutus* con patrones atípicos en los osteodermos nucales, por lo que se cree que ya ha habido hibridación en la zona; sin embargo, hasta ahora los individuos de ambas especies no se han estudiado con marcadores moleculares.

5.5. Implicaciones de la Hibridación en la conservación de especies

La hibridación ha sido parte de la evolución natural no sólo en especies de plantas, sino en especies de animales. Se ha demostrado que la hibridación es un mecanismo importante de producción de nuevas especies y nuevas adaptaciones (Arnold 1992, Allendorf *et al.* 2001, Allendorf y Luikart 2007). Esto puede ocurrir por dos vías, una de ellas ocurre cuando la descendencia híbrida presenta caracteres poco adaptativos, y son relegados hacia el aislamiento geográfico, por lo que sólo pueden reproducirse entre ellos, esto resulta en el origen de una nueva población con frecuencias alélicas diferentes a las originales (Hedrick 2005) aumentando así la adaptación promedio de la población y dando lugar a una nueva especie (Lewontin y Birch 1996); esta dinámica también podría resultar en la pérdida del legado del linaje evolutivo, producto de la introgresión de un genoma en otro (Arnold 1992, Allendorf y Luikart 2007). Existen algunos ejemplos que muestran que en ocasiones la hibridación interespecífica puede ser un aporte importante de variación genética, como lo ocurrido entre las dos especies de pinzones de las Galápagos, cuando el pinzón de campo aportó variación a la especie más rara, el pinzón de cactus (Grant y Grant 1998).

La otra vía por la que puede ocurrir especiación ocurre cuando existe vigor híbrido o heterosis; esto es cuando la descendencia híbrida presenta caracteres adaptativos más exitosos que los caracteres parentales; en un medio ambiente de transición estos caracteres pueden resultar en el éxito diferencial de los híbridos con respecto a los de las especies parentales, y por lo tanto encontrarse mejor adaptadas y ser más exitosas en dichos ambientes (Allendorf y Luikart 2007).

En especies simpátricas y con sus barreras reproductivas alteradas pueden ocurrir hibridaciones y generar progenie fértil; las zonas geográficas en las que ocurre esto han sido llamadas Zonas Híbridas (Allendorf y Luikart 2007). En ocasiones dentro de estas zonas, los híbridos son seleccionados en contra y así ser eliminados de la población, sin embargo; esto tiende a reducir el potencial reproductivo de la población y reducir la tasa de crecimiento poblacional más allá de las necesidades de reemplazamiento; esto también ocurre cuando se originan híbridos infértiles (Allendorf y Luikart 2007). Por otro lado, algunas zonas híbridas pueden ser estables y persistir por largos periodos de tiempo, existiendo un equilibrio entre la dispersión de los tipos parentales y la selección en contra de los híbridos (Allendorf et al. 2001)

La hibridación también puede contribuir al decaimiento y eventual extinción de las especies, ya que el aporte de alelos no adaptados a ciertas características ambientales reduce la adaptación media de la población, teniendo ésta menos éxito reproductivo (Allendorf y Luikart 2007).

La hibridación entre las dos especies de cocodrilos mexicanos podría ser una amenaza en el mantenimiento de su integridad genética (Ray *et al.* 2004, Ramos 2006, Allendorf y Luikart 2007, Sánchez-Vilchis 2007) pues la introgresión de un genoma hacia el otro podría resultar en la erosión o barrido genético y en la pérdida de diversidad de las poblaciones más pequeñas de ambas especies (Ray *et al.* 2004, Cedeño-Vázquez 2008). Se cree que las poblaciones que podrían ser más afectadas son las de *C. acutus*, ya que al parecer tienen poblaciones más pequeñas en comparación con las poblaciones de *C. moreletii* (Ray *et al.* 2004, Cedeño-Vázquez 2008, Casas- Andreu com. personal). Además de esto, es importante tomar en cuenta que los programas de aprovechamiento sustentable han estado enfocados principalmente a la cría de *C. moreletii*, dejando relegadas en los planes de aprovechamiento y cría intensiva no sólo a las poblaciones de *C. acutus* sino también a las de *Caiman crocodilus fuscus*, de la que hasta ahora no se tiene información en cuanto a estudios de diversidad genética se refiere.

A pesar de que se ha documentado la ocurrencia de hibridación entre las dos especies de cocodrilos mexicanos en zonas de distribución simpátrica, ya sea natural o bien por la intervención de la actividad humana; aún no se han identificado los mecanismos ecológicos por los cuales esta tiene lugar, ni los efectos que ésta tiene sobre la adecuación que los individuos presentan hacia su medio ambiente. Se ha hipotetizado que la hibridación podría aumentar la adecuación a través del vigor híbrido; ya que se han observado individuos *Crocodylus moreletii* con una mayor tolerancia hacia los ambientes salinos producto de la hibridación (Rodríguez 2007); sin embargo esto aún no se ha estudiado ampliamente.

Estudios relacionados con la medición de tasas de crecimiento, el número de nidadas y la sobrevivencia de éstas podría arrojar resultados importantes a cerca de las zonas de hibridación que se sabe han estado ocurriendo en la distribución geográfica natural de ambas especies. Estos estudios, aunados a estudios de identificación genética serían prioritarios para conocer los efectos que la hibridación tiene sobre la adecuación de los individuos (Cedeño 2007, Rodríguez 2007).

VIII. Conclusiones

- ♣ Los bajos niveles de diversidad genética encontrados en las localidades muestreadas de ambas especies, *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*, pueden ser resultado de la pérdida de variación a causa de cuellos de botella resultado de la sobreexplotación que las poblaciones tuvieron en el pasado. Sin embargo, la baja tasa de variación de un gen conservado como es el gen COI podría estar subestimando los niveles de variación genética; aunque los valores encontrados en este trabajo son similares a los evaluados con otros genes mitocondriales en otros estudios para estas especies.
- ♣ La poca diferenciación de los haplotipos ancestrales del gen COI evaluados, muestran que *C. acutus* y *C. moreletii* son especies evolutivamente muy cercanas, pertenecientes al grupo de los cocodrilos del nuevo mundo y que estos comparten un ancestro con el cocodrilo del Nilo (*C. niloticus*). Estos resultados coinciden con los encontrados con otros genes mitocondriales.
- ♣ Los estadísticos de diferenciación genética mostraron que los individuos evaluados presentan pocas diferencias entre sí; esto puede deberse a la naturaleza altamente vágil de estas especies, sobretodo de *C. acutus*; sin embargo, debido al bajo tamaño de muestra y a la naturaleza conservada del gen estudiado, es posible que la diferenciación de las poblaciones de cocodrilos causada por la actividad humana no esté siendo reflejada.
- ♣ La hibridación que se ha evidenciado con los últimos trabajos de identificación genética muestran que ésta ha sido originada por la actividad humana; principalmente debido a la introducción de individuos a zonas de distribución no originales.
- ♣ En este y otros trabajos se han evidenciado individuos con caracteres crípticos, difíciles de identificar fenotípicamente como híbridos. Esto puede ser un problema serio especialmente en las granjas en donde se reproducen ejemplares de *Crocodylus moreletii*, puesto que pueden tener individuos híbridos que están siendo comercializados como puros. El problema es aún mayor si individuos híbridos no caracterizados genéticamente están siendo reintroducidos a las poblaciones naturales.

- ♣ Los resultados del presente trabajo y de los realizados en otras zonas de distribución hasta ahora muestran las siguientes zonas de hibridación en el país: En Lagunas de Chacahua, Oaxaca y en la zona de Simpatría de las dos especies, localizada en el Caribe mexicano; son zonas de hibridación en vida silvestre. Buenavista, Tabasco y Cocodrilos Maya, Cd. Del Carmen, Campeche; constituyen zonas de hibridación en cautiverio y es prioritario hacer un seguimiento de las crías de los individuos reproductores, ya que estas no podrían ser liberadas en poblaciones naturales hasta conocer cuáles son las implicaciones de la reintroducción.

- ♣ Los individuos híbridos provenientes de Buenavista, Tabasco; son hembras reproductoras de la Granja comercializadora Coco Maya, Cd. Del Carmen, Campeche y esto corrobora la viabilidad reproductiva de los individuos híbridos.

- ♣ Debido a los procesos de hibridación que han estado sucediendo tanto en vida libre como en poblaciones en cautiverio, es necesario que la identificación genética de individuos destinados a la reproducción y reintroducción a poblaciones naturales sea prioritario para los programas de manejo y conservación. Por ello es prioritario realizar estudios enfocados a resolver el papel que juega la hibridación en la adecuación de las poblaciones.

IX. Referencias

- Aguirre-Planter, E. 2007.** *Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares*. En Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (Comp.) 2007. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D. F.
- Alderton, D. 2004.** *Crocodiles & alligators of the world*. Facts on File, Nueva York.
- Allendorf, F.W., R.F. Leary, P. Spruell, J.K. Wenburg. 2001.** The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16:613–622.
- Allendorf, F.W. y G. Luikart. 2007.** *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing. USA.
- Amos, W. y A. Balmford. 2001.** When does conservation genetics matter?. *Heredity* 87: 257–265.
- Álvarez del Toro, M. 1974.** *Los Crocodylia de México*. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables.
- Álvarez del Toro, M y L. Sigler. 2001.** *Los Crocodylia de México*. IMERNAR, PROFEPA. México.
- Arnold, M.L. 1992.** Natural Hybridization as an Evolutionary Process. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23 : 237-261.
- Arnold, M.L. y S.A. Hodges. 1995.** Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* 10: 67–71.
- Avise, J.C. 1992.** Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62–76.
- Avise, J.C., B.W. Bowen, T. Lamb, A.B. Meylan y E. Bermingham. 1992.** Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the *Testudines*. *Molecular Biology and Evolution* 9: 457–473.
- Avise, J.C. 1994.** *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall. Nueva York.
- Barban-Zucoloto, R., P.M. Schmidt-Villela, L. Martins-Verdade y L. Lehmann-Coutinho. 2006.** Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman spp.* and *Paleosuchus palpebrosus*). *Genetics and Molecular Biology* 29: 75-78.
- Bjorndal, K. A., A. B. Bolten y S. Troëng. 2005.** Population structure and genetic diversity in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology* 147: 1449-1457.
- Bowen, B.W. 1999.** Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8: S5–S10.

- Boyle, J.S. y A.M. Lew. 1995.** An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 1: 8.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang y A.C. Wilson. 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 1976–1971.
- Calsbeek, R., C. Bonneaud, S. Prabhu, N. Manoukis y T.B. Smith. 2007.** Multiple paternity and sperm storage lead to increased genetic diversity in *Anolis* lizards. *Evolutionary Ecology Research* 9: 495–503.
- Carranza, S., E.N. Arnold y J.M. Pleguezuelos. 2006.** Phylogeny, biogeography, and evolution of two Mediterranean snakes, *Malpolon monspessulanus* and *Hemorrhois hippocrepis* (Squamata, Colubridae), using mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 532-546.
- Casas-Andreu, G. 1995.** Los cocodrilos de México como recurso natural. Presente, pasado y futuro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 46: 153-162.
- Casas-Andreu, G. 2003.** Ecología de la anidación de *Crocodylus acutus* (Reptilia: Crocodylidae) en la desembocadura del río Cuitzmala, Jalisco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 89: 111-128.
- Casas-Andreu, G. y X. Aguilar-Miguel. 2007.** *Metodologías Aplicadas a la Investigación ejemplificadas con cocodrilos.* Software Multimedia. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Casas-Andreu, G. 2010.** Contribuciones para la historia del conocimiento de los cocodrilos en México. *Revista Latinoamericana de Conservación* 1: 17-24.
- Cedeño-Vázquez, J.R. 2002.** Estado de conservación de *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii* en el Río Hondo, Bahía de Chetumal, y áreas anexas, Quintana Roo, México. Tesis de Maestría. *Colegio de la Frontera Sur*, México.
- Cedeño-Vázquez, J.R. 2008.** Genética de poblaciones, flujo genético e hibridación de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en la península de Yucatán, México. Tesis de Doctorado. *Colegio de la Frontera Sur*. Chetumal, Quintana Roo. México.
- Cedeño-Vázquez J.R., D. Rodríguez, S. Calmé, J.P. Ross, L.D. Densmore III y J.B. Thorbjarnarson. 2008.** Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: I. Evidence from Mitochondrial DNA and Morphology. *Journal of Experimental Zoology* 309 A: 661–673.
- Clement, M., D. Posada y K.A. Krandall. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- COMACROM. 2000.** *Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Crocodylia de México.* Secretaría de Medio, Recursos Naturales y Pesca-Instituto de Ecología, México, DF.

- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES). 1995.**
Guía de Identificación de los Cocodrilos protegidos por la CITES. Minister of Supply and Services of Canada.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES). 2008.**
 Apéndices I, II y III. Disponible en <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>
- Davis, L.D., T.C. Glenn, R.M. Elsey, H.C. Dessauer, R.H. Sawyer. 2001.** Multiple paternity and mating patterns in the American Alligator, *Alligator mississippiensis*. *Molecular Ecology* 10: 1011–1024.
- Dessauer, H.C., T.C. Glenn y L.D. Densmore. 2002.** Studies on the Molecular Evolution of the Crocodylia: Footprints in the Sands of Time. *Journal Of Experimental Zoology* 294: 302–311.
- Dever, J.A., R.E. Strauss, T.R. Rainwater, S.T. McMurry y L.D. Densmore III. 2002.** Genetic Diversity, Population Subdivision, and Gene Flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* 4: 1078–1091.
- Dow, L. 1990.** *Alligators and crocodiles.* Facts on File. Nueva York, USA.
- Doyle, J.J. y B.S. Gaut. 2000.** Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Molecular Biology* 42: 1-6.
- Eaton, M.J., G.L. Meyers, S.O. Kolokotronis, M.S. Leslie, A.P. Martin y G. Amato. 2010.** Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics* 11: 1389–1404.
- Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1990.** *Genética de la Conservación: leones vemos, genes no sabemos.* Ciencias. Número especial 4. Ecología y conservación en México: 34 –47. Reimpreso en: Nuñez-Farfán, J. y L. E. Eguiarte (editores). La evolución biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, CONABIO.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005.** ARLEQUIN Ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Informatics Online* 1: 47-50.
- Farias, I.P., R. Da Silveira, B. de Thoisy, L.A. Monjeló, J. Thorbjarnarson y T. Hrbek. 2004.** Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodylians. *Animal Conservation* 7: 265-272.
- Field, K., G. Olsen, D. Lane, S. Giovannoni, M. Ghiselin, E. Raff, N. Pace y R. Raff. 1988.** Molecular phylogeny of the animal Kingdom. *Science*. 239: 748-752.
- FitzSimmons, N.N., J.C. Buchan, P.V. Lam, G. Polet, T.T. Hung, N.Q. Thang y J. Gratten. 2002.** Identification of purebred *Crocodylus siamensis* for reintroduction in Vietnam. *Journal of Experimental Zoology* 294: 373-381.
- Flint, N.S., F.H. van der Bank y J.P. Grobler. 2000.** A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA* 26:105–110.

- Folmer, M.O., B.W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Fu, Yun-Xin y Wen-Hsiung Li. 1993.** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics Society of America* 133: 693-709.
- Glenn, T., H.C. Dessauer y M. Braun. 1998.** Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. *Copeia* 1998: 591–602.
- Glenn, T.C., J.L. Staton, A.T. Vu, L.M. Davis, J.R. Alvarado-Bremer, W.E. Rhodes, I.L. Brisbin y R.R.H. Sawyer. 2002.** Low Mitochondrial DNA Variation among American Alligators and a Novel Non-Coding Region in Crocodilians. *Journal of Experimental Zoology* 294: 312–324.
- González-Porter, G.P., F. Hailer, O. Flores-Villela, R. García-Anleu y J.E. Maldonado. 2011.** Patterns of genetic diversity in the critically endangered Central American river turtle: human influence since the Mayan age?. *Conservation Genetics* 12:1229–1242.
- Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hekkala, R.E. 2004.** Conservation Genetics at the Species Boundary: Case studies from African and Caribbean Crocodiles (genus: *Crocodylus*). Tesis de Doctorado. Graduate School of Arts and Sciences. Columbia University.
- Hedrick, P.W. 2005.** *Genetics of Populations*. 3th ed. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts. EUA.
- Hedrick, P.W. y P.S. Miller. 1992.** Conservation Genetics: Techniques and Fundamentals. *Ecological Applications* 2: 30-46.
- Hebert N.D.P., A. Cywinska, S.L. Ball y J.R. deWaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313–321.
- Hillis M.D y C.Moritz. 1990.** *Molecular Systematics*. Sinaur Associates, Inc, Publishers. Massachusetts, EUA.
- Hudson, R.R., D.D. Boos y N.L. Kaplan. 1992 a.** A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution* 9: 138–151.
- Hudson R.R., M. Slatkin y W.P. Maddison. 1992 b.** Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583 – 589.
- INE. 1995.** Atlas de Reservas de la Biosfera y otras áreas naturales protegidas. 1ª edición SEMARNAP.
- IUCN. 2007.** Crocodile Specialist Group 1996. *Crocodylus acutus*. In: IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/5659/summ>
- Jukes, T.H., y C.R. Cantor. 1969.** Evolution of protein molecules, pp. 21-132. En Munro, H. N. (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, Nueva York.
- Karp, A., P.G. Isaac y D.S. Ingram. 1998.** *Molecular Tools for screening Biodiversity*. Champman and Hall, Nueva York.

- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Lawson, R., C.P. Kofron y H.C. Dessauer. 1989.** Allozyme variation in a natural population of the Nile crocodile. *American Zoologist* 29: 863–871.
- Lewontin, R.C. y L.C. Birch. 1996.** Hybridization as a Source of Variation for Adaptation to New Environments. *Evolution* 20:315-336.
- Li, W-H. y D. Graur. 2000.** *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachussets.
- Li, Y., X. Wu, X. Ji, P. Yan y G. Amato. 2007.** The Complete Mitochondrial Genome of Salt-water Crocodile (*Crocodylus porosus*) and Phylogeny of Crocodylians. *Journal of Genetics and Genomics* 34: 119-128.
- Lynch, M. y T.J. Crease. 1990.** The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution* 7: 377-394.
- Mamuris, Z., M.T.H. Stoumboudi, C. Stamatis, R. Barbierai, y K.A. Moutou. 2005.** Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation. *Freshwater Biology* 50: 1441-1453.
- Mader, D.R. 1996.** *Reptile Meicine and Surgery*. 2da ed. Saunders/Elsevier. St. Louis Missouri, USA.
- Machkour-M'Rabet, S., Y. Hénaut, P. Charruau, M. Gevrey, P. Winterton y L. Legal. 2009.** Between introgression events and fragmentation, islands are the last refuge for the American crocodile in Caribbean Mexico. *Marine Biology* 156: 1321-1333.
- McAliley, L.R., R.E. Willis, D.A. Ray, P.S. White, C.A. Brochu y L.D. Densmore III. 2006.** Are crocodiles really monophyletic?—Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 16–32.
- McVay, J.D., D. Rodriguez, T.R. Rainwater, J.A. Dever, S.G. Platt, S.T. McMurry, M.R.J. Forstner y L.D. Densmore. 2008.** Evidence of Multiple Paternity in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, Inferred from Microsatellite Markers. *Journal of Experimental Zoology* 309A: 643–648.
- Moritz C. 2002.** Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51: 238 - 254.
- Muñiz, M. I., D. Montes y A. Hernández de Luna. 1997.** Observaciones técnicas sobre cocodrilos en lagunas de Chacahua, Oaxaca. *Crocodile Specialist Group Newsletter. IUCN World Conservation Union/SSC* 16: 12-13.
- Nei, M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. Nueva York.

- Nei, M. y T. Gojobori. 1986.** Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3: 418-426.
- Nei, M y J.C. Miller. 1990.** A simple method for estimating average number of nucleotide substitution within and between populations for restriction data. *Genetics* 125: 873–879.
- Nei, M. y S. Kumar. 2000.** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Nueva York.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998.** What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361–382.
- Petit, R.J., A. El Mousadik y O. Pons. 1998.** Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. *Conservation Biology* 12: 844 – 855.
- Ponce-Campos, P. y J.M. Dubach. 2004.** Variabilidad Genética del “Caimán” *Crocodylus acutus* en la Costa de Jalisco, México. *Memorias de la VI Reunión de Trabajo de la COMACROM*. Puerto Vallarta, Jalisco, México 25-27 de agosto.
- Platt, S.G. 1996.** *The Ecology and Status of Morelet’s Crocodile in Belize*. Tesis de Doctorado. Clemson University, Clemson, South Carolina.
- Platt S.G. y J.B. Thorbjarnarson. 2000.** Population status and conservation of Morelet’s crocodile, *Crocodylus moreletii*, in northern Belize. *Biological Conservation* 96: 21–29.
- Ramos, R., V. de Buffrenil, J.P. Ross. 1994.** Current status of the Cuban crocodile, *Crocodylus rhombifer*, in the wild. En: *Crocodiles; Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN – World Conservation Union*. IUCN, Gland, Switzerland. 1: 113–140.
- Ray, A.D., J.A. Dever, S.G. Platt, T.R. Rainwater, A.G. Finger, S.T. McMurry, M.A. Batzer, B. Barr, P.J. Stafford, J. McKnight y L.D. Densmore. 2004.** Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conservation Genetics* 5: 449–462.
- Remigio, A.E. y P.D.N. Hebert. 2003.** Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 641–647.
- Rocha M. y J. Gasca. 2007.** Ecología Molecular de la Conservación. En Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Comp.) *Ecología Molecular*. 2007. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D. F.
- Rodríguez, D. 2007.** *Crocodilian Evolution, Systematics and Population Genetics: Recovery and ecological interactions of the American Crocodile (Crocodylus acutus)*. Tesis de Doctorado. Texas Tech University.

- Rodriguez, D., J.R. Cedeño-Vázquez, M.R.J. Forstner, y L.D. Densmore. 2008.** Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: II. Evidence from Microsatellites. *Journal of Experimental Zoology* 309A:674–686.
- Ross, C.A. y F.D. Ross. 1974.** Caudal scalation of Central American *Crocodylus*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 87, 231–234.
- Ross, J.P. (ed.). 1998.** *Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan*. 2ª Edición. UICN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-Delbarrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sánchez-Vilchis, M. 2007.** Análisis de la Variación Genética de *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii* en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- SEMARNAP. 1996.** Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. *Programa de Áreas Naturales Protegidas de México 1995-2000*. México.
- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002.** *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección ambiental. Especies Nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión y cambio. Lista de especies en riesgo*. Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial, segunda sección. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/informacion/catalogo_autoridades/.
- NOM-059-SEMARNAT-2001/NOM-059-SEMARNAT-2001.pdf**
- Serrano-Gómez, S.S. 2010.** *Variabilidad genética de la Región Control del ADN mitocondrial en el Cocodrilo de Río (Crocodylus acutus, Cuvier 1807) de la costa de Oaxaca, México*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.
- Simmons, R. B. y S. J. Weller. 2001.** Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 196-210.
- Sunnucks, P. 2000.** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199–203.
- Sugg, D.W. y R.K. Chesser. 1994.** Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics* 137:1147–1155.
- Taberlet, P. 1996.** The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. En Smith, T.B. y R.K. Wayne. (eds.) 1996. *Molecular genetics approaches*. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.
- Tamura, K. y M. Nei. 1993.** Estimation of the number of the nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.

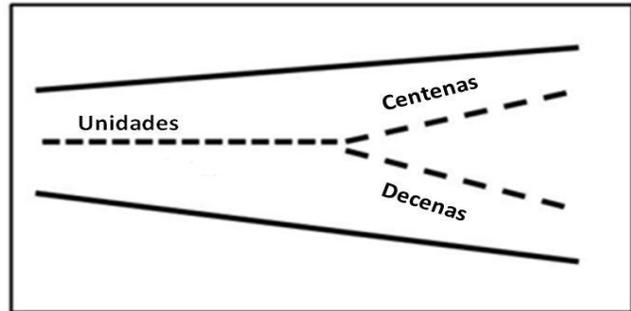
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Templeton, R.A., K.A. Crandall y C.F. Sing. 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Templeton, R.A., E. Routman y C.A. Phillips. 1995.** Separating population structure from populations history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Vasconcelos W.R., T. Hrbek, R. Da Silveira, B. de Thoisy, B. Marioni e I.P. Farias. 2006.** Population genetic analysis of Caiman crocodilus (Linnaeus, 1758) from South America. *Genetics and Molecular Biology* 29: 220 - 230.
- Zane, L., W.S. Nelson, A.G. Jones y J.C. Avise. 1999.** Microsatellite assessment of multiple paternity in natural populations of a live-bearing fish, *Gambusia holbrooki*. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 61–69.

Anexo 1.

Obtención de muestras sanguíneas del seno venoso occipital y por medio del corte de quilla



Extracción de sangre del seno venoso occipital



Marcaje de Quilla y obtención de escamas

Anexo 2.

Protocolo de Purificación de DNA a partir de Sangre Kit DNeasy Blood & Tissue de QiaGen

Notas importantes antes de comenzar

Preparación del Buffer AW1 y AW2

Ambos Buffers vienen como concentrados, antes de ser usados deben ser diluidos con Etanol (96 – 100 %), al volumen indicado en el recipiente. Agitar vigorosamente.

Nota: ambos son estables por un año después de la adición de etanol y almacenado a temperatura ambiente (15 – 25 °C).

Buffer AL

El Buffer AL debe ser adicionado a la muestra e incubado a 56 °C antes de adicionar el etanol.

Nota: Es importante que el etanol no sea adicionado a la muestra antes del Buffer AL.

- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15 – 25 °C).
- La agitación en el vórtex se realiza por 5 a 10 seg.
- El Buffer AL puede formar un precipitado durante el almacenamiento. Es necesario calentarlo a 56 °C hasta que dicho precipitado se disuelva por completo.
- Es importante precalentar el termoagitador, el baño con agua o la plataforma térmica a 56 °C para su uso en el paso 2.

Procedimiento

Eritrocitos Nucleados

1. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 o 2 ml (no proporcionado) agregar 20 μ l de Proteinasa K. adicionar de 5 a 10 μ l de sangre anticoagulada. Ajustar el volumen a 220 μ l con PBS.
2. Agregar 200 μ l de Buffer AL (*sin etanol*). Mezclar vigorosamente en vórtex e incubar a 56 °C por 10 min.
Nota. Es esencial que la muestra y el Buffer AL sean mezclados inmediatamente y obtener una solución homogénea.
3. Agregar a la muestra 200 μ l de etanol (96 – 100%), mezclar vigorosamente en vórtex; obtener una solución homogénea.
4. Colocar la mezcla del paso 3 dentro de una columna con tubo colector de 2 ml. Centrifugar a ≥ 6000 xg/ 8000 rpm. Desechar el sobre nadante del tubo colector.
5. Colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 500 μ l de Buffer AW1 y centrifugar por 1 min a ≥ 6000 xg/ 8000 rpm. Desechar el sobre nadante del tubo colector.
6. Colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 500 μ l de Buffer AW2 y centrifugar por 3 min a 20,000 xg/ 14,000 rpm para secar la membrana de la columna. Desechar el sobrenadante del tubo colector. Remover la columna cuidadosamente.
Nota: Es importante que la membrana se encuentre completamente seca, pues el etanol podría interferir con el resultado de la elución. Y que la columna no toque el sobre nadante.
7. Colocar la columna en tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5-2 ml. Agregar 200 μ l de Buffer AE directamente sobre la membrana de la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar por 1 min a ≥ 6000 xg/ 8000 rpm para eluir.
Nota: la elución con 100 μ l (en lugar de 200 μ l) incrementa la concentración final de DNA, pero también disminuye el rendimiento total de DNA.
8. Recomendado: Para maximizar el rendimiento del DNA obtenido, repetir la elución como se describe en el paso 7.
Nota: No eluir más de 200 μ l en el tubo de 1.5 ml, pues la columna podría tener contacto con el eluido.

Anexo 3.

Purificación de Fragmentos de ADN con Yoduro de Sodio.

- Realizar la electroforesis del producto a purificar en agarosa-TAE.
- Recortar la banda con ayuda de un transiluminador.
- Pesar el fragmento (1g=1ml) y adicionar 3 volúmenes de yoduro de sodio 6M.
- Incubar 5-10 min a 55°C, hasta que la agarosa se disuelva.
- Adicionar 15 ul de perlas de sílica, incubar 30-60 min a 4 °C.
- Centrifugar 4 min/12,000 rpm/4°C.
- Decantar y resuspender la pastilla con 500 ul de solución de lavado, centrifugar 4 min/12,000 rpm/4°C. Repetir una vez mas este paso.
- Decantar, secar la pastilla por calor
- Resuspender en \cong 30 μ l de agua didestilada estéril, incubar 55°C/5 min.
- Centrifugar 12,000 rpm/4 min/TA.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.
- Visualizar 5 ul de la purificación en un gel de agarosa.

Solución de lavado: NaCl 50mM, Tris HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v.

Perlas de sílica: Preparar una suspensión de sílica a 100 mg/ml en PBS, centrifugar 2 min/2,000g. Resuspender la pastilla a una concentración final de 100 mg/ml en NaI 3M. Alicuotar en volúmenes de 500 ul y cubrir de la luz con papel aluminio. Refrigerar.

*Boyle J.S. and Lew A.M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends in genetics. 11(1):8.

Anexo 4.

Precipitación de Fragmentos Amplificados por medio de Sephadex G50

- 1) Colocar 650 μ l de Sephadex G-50 bien agitado en una columna (Centri-Sep).

Nota: Asegurarse que la columna y el tubo de recolección se encuentren secos y limpios. Evitar la formación de burbujas en el fondo de la columna.

- 2) Colocar la columna dentro del tubo de recolección. Centrifugar por 3 min a 2400 RPM.

Nota: Orientar las columnas con la marca hacia afuera en la microcentrífuga.

- 3) Remover la columna del tubo de recolección y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 ml etiquetado.

- 4) Agregar 10 μ l de agua bidestilada a cada producto de reacción de secuenciación (para un volumen final de 21 μ l).

Nota: El agua facilita el movimiento de los productos de secuenciación a través de la columna de Sephadex.

- 5) Colocar el producto de secuenciación al centro de la columna con la resina de Sephadex G-50 (no a los lados).

Nota: No se debe tocar la resina con la punta de la pipeta.

- 6) Centrifugar por 3 min a 2400 rpm,

Nota: Asegurarse de orientar los tubos de igual manera que en la centrifugación anterior.

- 7) Secar el producto de secuenciación que quedo en el tubo eppendorf de 1.5 ml en una centrifuga al vacio.

Nota: Se puede calendar pero no se debe dejar secar por mucho tiempo.

- 8) Las muestras se pueden guardar en el refrigerador o congelador hasta ser llevadas a secuenciar.

Preparación de Sephadex G-50

- Pesar 5.0 g del polvo G-50 (Sephadex, Sigma S-5897-100G) y colocar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Agregar 75 ml de agua bidestilada y tapar con una sanita para evitar evaporación.
Nota: Marcar el nivel de agua en el matraz para observar la posible pérdida de volumen durante el calentamiento.
- Calentar en el microondas por 10 min en potencia baja (10% del poder total).
Nota: Monitorear el calentamiento evitando que hierva.
- Sacar del microondas y agregar el agua que se haya evaporado.
- Agitar con ayuda de un imán y tapar con parafilm.
- Usar a 4 °C.

Nota: Mantener a 4 °C. Es útil bajo esas condiciones entre 3 a 4 semanas

La limpieza de la reacción de secuenciación debe completarse dentro de las 24 horas siguientes a la reacción de secuenciación.

Para poder agregar el Sephadex G50 a las columnas de precipitación; éste se coloca en un matraz Erlenmeyer a 4 °C sobre un agitador magnético para evitar que la solución se precipite.

