



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL  
COCODRILO AMERICANO (*Crocodylus acutus*) Y DEL  
COCODRILO DE PANTANO (*Crocodylus moreletii*) EN TRES  
POBLACIONES DE CHIAPAS, MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**OSCAR ROMERO BÁEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**

**Los Reyes Iztacala, Edo. de México 2015**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre.  
Charle Darwin

Un ser humano es parte del todo que llamamos Universo, una parte limitada en el tiempo y en el espacio. Está convencido de que él mismo, sus pensamientos y sus sentimientos, son algo independiente de los demás, una especie de ilusión óptica de su conciencia. Esa ilusión es una cárcel para nosotros, los limita a nuestros deseos personales y a sentir afecto por los pocos que tenemos más cerca. Nuestra tarea tiene que ser liberarnos de esa cárcel, ampliando nuestro círculo de compasión, para abarcar a todos los seres vivos y a toda la naturaleza.

Albert Einstein

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de genéticas y ecología, del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Oscar Romero Báez agradece el apoyo de Beca de tesis de licenciatura, otorgada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), dentro del proyecto número IN202713 “Diversidad genética, estructura poblacional e hibridización en cocodrilos (*Crocodylus moreletii* y *Crocodylus acutus*) del Golfo y Caribe mexicanos”.

## **Dedicatoria**

Este trabajo que me llevo unos años de mi existencia se la dedico a la señora Amada Báez Rosas, quien respeto y admiro con todo mi ser por la gran labor de instruirme en este camino llamado vida... A ella todo mi amor y respeto... Muchas gracias madre.

## **Agradecimientos**

Al fin he llegado a esta parte y toca agradecer a muchos por haberme apoyado en este ciclo. Volteo atrás y me doy cuenta como este niño biólogo ha crecido en este camino, el cual estuvo lleno de muchas emociones y aventuras, pero que sin la ayuda de ciertas personas no lo hubiera logrado, por lo que estas palabras se las escribo con grata sinceridad a todos ustedes.

Primero que nada quisiera agradecer a mi familia, la cual siempre la he tenido en mi mente, aunque parezca que no, siempre están en ella. Especialmente mi madre que siempre confió en mí y aquí está la prueba de ello, además de mis hermanos Vicky, Armando, Javier, Fredy y Mario, a todos ellos gracias.

Ahora me toca agradecerle a esta bonita y hermosa Universidad, por darme tanto y permitirme crecer como persona. En ella he aprendido muchas cosas, y no solo conocimientos sobre la biología, sino también de la vida propia, gracias de verdad muchas gracias. Prometo que algún día retribuiré todo lo otorgado preciosa UNAM.

También quiero agradecerle enormemente a la Dra. Ella Vázquez Domínguez, por aceptar, a este biólogo loco gustoso de los reptiles, en su laboratorio. Gracias por confiar en mí en todo momento, a pesar de las adversidades. Sin su ayuda este trabajo no se hubiera logrado, gracias infinitas por todo.

En este párrafo me gustaría agradecerle al M. en C. Gualberto Pacheco Sierra (alias Chunko), por su disposición en enseñarme e instruirme en esto de los cocodrilos y su genética desde un inicio de esta aventura. Sin él no sé qué hubiera hecho en muchas situaciones cuando prácticamente no veía la luz en el camino académico. Muchas pero muchas gracias por tu ayuda Chunko.

Igualmente a quien le quiero agradecer es al Biol. Jerónimo Domínguez Laso y su equipo cocodrilero, ya que sin su ayuda hubiese sido mucho más difícil capturar a todos esos simpáticos y fieros cocodrilos. Asimismo, gracias por enseñarme y compartir tu contagiante pasión por estos impresionantes reptiles.

Gracias a mis sinodales, Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga, Dr. Jorge Campos Contreras, Dr. Elías Piedra Ibarra y M. en C. Gualberto Pacheco Sierra. Con sus comentarios me ayudaron a enriquecer enormemente este trabajo, que hasta en el último momento sufrió de cambios. Muchas gracias.

Agradezco a los amigos que me acompañaron a lo largo de la carrera en la Facultad, con ellos vaya que si pase muchas aventuras y situaciones variadas, muy bellos recuerdos. Muchas gracias Daniel, Pedro, Ana, Maricarmen, Tomas, Olga, Karen, Juan Carlos y Sandra; esas charlas de biólogos frikis camino a campo, las noches de parranda en Veracruz, así como las infinitas desveladas y platicas las recordaré siempre como un bonito recuerdo de nuestro camino hacia la biología.

Del mismo modo, quiero agradecer a los amigos y compañeros del laboratorio más pro (Genética y Ecología) del Instituto de Ecología, ya que sin su apoyo no sé qué hubiera hecho en los momentos que de plano estaba más atorado. Muchas gracias Alejandro, Tania, Sayra, Gual, Laura, Marco, Susette, Gaby, Donaji, Tonatiuh, Ricardo, Raúl, Erick y Alfredo; ustedes hicieron más llevadero y un poco más fácil este proceso llamado tesis.

Asimismo, quiero darle las gracias al Dr. Fausto Méndez de la Cruz y a su banda herpetológica del Instituto de Biología, es decir, a Diego, Franklin, Francisco, Marcos, Oscar, Alberto y Mirna; ya que gracias a ustedes pude aprender mucho más acerca de los reptiles, provocando que mi gusto por ellos aumentara, especialmente por los cocodrilos.

Gracias también a Raquel, Omar, Adonis, Aketzalli, David, Javier, Esmeralda, Bismarck, Gloria y Dalila, amigos que encontré en ese bonito lugar llamado Universum, con los cuales de verdad logre mejorar no solo como biólogo, sino también como persona. Todas las cosas vividas con ustedes, así como esas charlas tan extensas de nuestras tesis, así como de las cosas que nos pasaban día a día fueron muy gratificantes y siempre las recordare. Gracias por ofrecerme su amistad. Del mismo modo, le doy las gracias a una persona especial que también encontré en el museo y que me acompañó en el final de este proceso, muchas gracias Marisol por escucharme y tratar de comprenderme hasta en los malos momentos, gracias totales.

Finalmente, no podía olvidar agradecer a los amigos de la colonia, que a su manera me brindaron su apoyo. Gracias Armando, Fernando R., Daniel, Fernando I., Marcos, Cirilo y Julio por escucharme y darme su amistad.

# Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Genética de poblaciones	3
1.2 Variabilidad genética	4
1.3 Estimación de la variabilidad genética	5
1.4 Estructura genética	7
1.5 Estimación de la estructura genética	7
1.6 Marcadores moleculares	10
2. Antecedentes	12
2.1 Los Crocodylidae en México	12
2.2 Diversidad y estructura genética en cocodrilos	14
2.3 Evidencias de hibridación en cocodrilos	15
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	17
4.1 General	17
4.2 Particulares	17
5. Materiales y métodos	18
5.1 Áreas de estudio	18
5.2 Obtención de muestras y trabajo de campo	19
5.3 Trabajo de laboratorio	20
5.4 Análisis	21
5.4.1 Alelos nulos y “ <i>stuttering</i> ”	21
5.4.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	21
5.4.3 Diversidad genética	21
5.4.4 Estructura y diferenciación genética	22
5.4.5 Hibridación e introgresión	23
6. Resultados	25
6.1 Número de individuos analizados genéticamente	25
6.2 Alelos nulos y “ <i>stuttering</i> ”	25
6.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	25
6.4 Diversidad genética	26

6.5 Estructura y diferenciación genética	28
6.6 Hibridación e introgresión	32
7. Discusión	36
7.1 Diversidad y estructuración genética	36
7.2 Hibridación en las poblaciones de Chiapas estudiadas	38
7.3 Aspectos de conservación	40
8. Conclusiones	42
9. Referencias	43
10. Anexos	53
Anexo 1. Inventario de muestras utilizadas en el presente estudio	53
Anexo 2. Extracción de DNA	56
Anexo 3. Microsatélites utilizados para <i>C. acutus</i> y <i>C. moreletii</i>	59
Anexo 4. Concentración y volumen de los reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	60
Anexo 5. Condiciones del termociclador para la amplificación de microsatélites por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	61
Anexo 6. Valores de desequilibrio de ligamiento para todas las combinaciones de loci posibles	63
Anexo 7. Estadísticos $F$ por locus obtenidos mediante el método de Weir y Cockerham	64
Anexo 8. Estadísticos de diferenciación genética de $G'_{ST}$ y $D_{Est}$	65
Anexo 9. Coeficiente $F_{ST}$ por locus con y sin corrección ENA para alelos nulos	66
Anexo 10. Distancias genéticas pareadas de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) (D) por locus con y sin corrección INA para alelos nulos	66
Anexo 11. Diferenciación alélica y genotípica entre poblaciones por locus	67
Anexo 12. Valores del índice de hibridación e intervalos de confianza (95%) para las tres poblaciones	68
Anexo 13. Frecuencias genotípicas de las diferentes categorías híbridas	70

## Resumen

La genética de poblaciones estudia los patrones y causas de la variabilidad genética en las poblaciones, tomando en cuenta a la deriva génica, mutación, sistema de apareamiento, migración y selección natural, como generadores de cambio en las frecuencias genéticas a través del tiempo y el espacio en las especies. En este trabajo se estimó la diversidad y estructura genética de *Crocodylus moreletii* y *Crocodylus acutus* en tres poblaciones del estado de Chiapas y se determinó si existía evidencia de hibridación en alguna de estas poblaciones, con base en 10 loci de microsatélites. La diversidad genética para cada población mostró que Villa Flores y El Aguacate ( $H_o = 0.510$  y  $H_e = 0.543$ ;  $H_o = 0.565$  y  $H_e = 0.538$ , respectivamente; *C. moreletii*) tuvieron valores más altos, en comparación con la población Cañón del Sumidero ( $H_o = 0.426$  y  $H_e = 0.500$ ; *C. acutus*). Los valores de diferenciación genética fueron significativos entre todas las comparaciones posibles, encontrándose los valores más altos entre El Aguacate y Cañón del Sumidero ( $F_{ST} = 0.325$ ,  $G'_{ST} = 0.198$  y  $D_{Est} = 0.538$ ) y los más bajos entre Villa Flores y El Aguacate ( $F_{ST} = 0.033$ ,  $G'_{ST} = 0.015$  y  $D_{Est} = 0.052$ ). No obstante, el análisis molecular de varianza indicó que la distribución de la variación genética está mayormente dentro de los individuos. Se encontró evidencia de mezcla genética en individuos de las tres poblaciones a través de un índice de hibridación, donde El Aguacate y Villa Flores presentaron un mayor número de individuos híbridos. Los datos de introgresión no fueron consistentes para encontrar un patrón claro de este proceso con los loci utilizados, ni para corroborar si alguno de éstos estaba bajo selección natural. Finalmente, *C. moreletii* presentó mayores niveles de diversidad genética comparado con *C. acutus*, además de que entre las dos especies hubo estructuración y diferenciación genética significativa, lo cual puede estar asociado con los apareamientos híbridos que están ocurriendo en las poblaciones de El Aguacate y Villa Flores.

**Palabras clave:** diversidad genética, estructura genética, microsatélites, hibridación, *Crocodylus*

## Abstract

Population genetics studies the patterns and causes of genetic variability in populations, taking into account processes like genetic drift, mutation, migration and natural selection, including the mating system, as drivers of change in gene frequencies over time and space in species. In this study the genetic diversity and structure of *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* was estimated in three populations of Chiapas; evidence of hybridization among populations was also investigated, based on 10 microsatellite loci. Genetic diversity results for each population showed that Villa Flores and El Aguacate ( $H_o = 0.510$  y  $H_e = 0.543$ ;  $H_o = 0.565$  y  $H_e = 0.538$ , respectively; *C. moreletii*) had higher values compared with Cañón del Sumidero ( $H_o = 0.426$  y  $H_e = 0.500$ ; *C. acutus*). Genetic differentiation was significant among all possible comparisons, with the highest values between El Aguacate and Cañón del Sumidero ( $F_{ST} = 0.325$ ,  $G'_{ST} = 0.198$  y  $D_{Est} = 0.538$ ) and the lowest among Villa Flores and El Aguacate ( $F_{ST} = 0.033$ ,  $G'_{ST} = 0.015$  y  $D_{Est} = 0.052$ ). The analysis of molecular variance indicated that most of the genetic variation was distributed within individuals. Evidence of genetic admixture was observed in individuals from the three populations, where El Aguacate and Villa Flores showed a higher number of hybrid individuals. Introgression data was not consistent to find a clear pattern of this process with the loci used, nor to confirm whether any of them was under natural selection. Finally, *C. moreletii* had higher levels of genetic diversity in comparison with *C. acutus*; in addition the two species showed a significant structure and genetic differentiation, which may be associated with the hybrid matings occurring in El Aguacate and Villa Flores.

**Keywords:** genetic diversity, genetic structure, microsatellites, hybridization, *Crocodylus*

# 1. Introducción

## 1.1 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones estudia los patrones y causas de la variabilidad genética en las poblaciones, así como el cambio de las frecuencias alélicas y genotípicas que ocurren a través del tiempo y espacio (Freeman y Herron, 2002; Piñero *et al.*, 2008b; Hedrick, 2011). Por lo tanto, proporciona los principios teóricos de la evolución, ya que parte de la premisa de que los cambios evolutivos a pequeña escala, ocurridos dentro y entre las poblaciones, explican el proceso evolutivo de las especies (Barbadilla, 2005).

La teoría de ésta disciplina se fundamenta en el principio del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), que es una herramienta algebraica útil para predecir las frecuencias genéticas cuando una población se encuentra en equilibrio, la cual parte de ciertos supuestos:

- ✚ La población es diploide, con reproducción sexual y generaciones discretas.
- ✚ El tamaño poblacional es infinitamente grande.
- ✚ Los apareamientos son aleatorios.
- ✚ Los genes no mutan de un estado alélico a otro.
- ✚ No hay agregación de genes externos a la población.
- ✚ Todos los individuos tienen la misma probabilidad de sobrevivir y de reproducirse.

Por lo tanto, si se cumplen tales circunstancias, las frecuencias genéticas se mantendrán constantes de una generación a otra, conservando así la composición alélica de la población. Por el contrario, si al menos una de estas condiciones no se cumple, provocará un cambio en las frecuencias, principalmente por la influencia de alguna fuerza o proceso evolutivo-ecológico. (Ortiz *et al.*, 2000; Freeman y Herron, 2002; Hamilton, 2009; Hedrick, 2011). De esta manera, para observar tales cambios el Equilibrio de Hardy-Weinberg utiliza dos ecuaciones:

$$p + q = 1$$

(Ecuación 1)

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

(Ecuación 2)

donde:  $p$  = frecuencia del alelo dominante (A)

$q$  = frecuencia del alelo recesivo (a)

$p^2$  = frecuencias del genotipo AA

$pq$  = frecuencias del genotipo Aa

$q^2$  = frecuencia del genotipo aa

La primera ecuación se refiere a la suma de las frecuencias de todos los alelos que hay en la población, mientras que la segunda, formulada mediante un binomio cuadrado perfecto, es la suma de las frecuencias genotípicas de la población.

## 1.2 Variabilidad genética

La variación genética es considerada como un indicador positivo para la evolución de las poblaciones, debido a que se ha observado que valores altos, en general, incrementa el potencial de responder de una mejor manera a cambios ambientales, enfermedades o parásitos, mientras que su ausencia puede limitar dicha capacidad (Amos y Harwood, 1998).

El nivel de variación dentro de una población está directamente afectada por diferentes procesos que tienden a aumentar o disminuir dichos niveles (Hedrick, 2011) y que no actúan de manera aislada en las poblaciones. Por lo anterior, es importante entender los procesos que afectan la variación genética para comprender adecuadamente la evolución de las poblaciones en las diferentes especies (Andrews, 2010), los cuales son:

- ✚ **Selección natural:** proceso que permite explicar las adaptaciones de los organismos (Barbadilla, 2005) y ocurre cuando los individuos con cierto genotipo tienen mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse en comparación con otros individuos que poseen diferentes genotipos (Futuyma, 2005; Andrews, 2010). Dicho de otra forma, es la sobrevivencia y reproducción diferencial de los individuos de una especie (Eguiarte, 1999), donde los individuos presentan variación en adecuación, causando que se favorezcan ciertas adaptaciones locales en diferentes ambientes, favoreciendo distintos alelos de un locus (Slatkin 1985; Slatkin, 1989).
- ✚ **Mutación:** fuente principal de variación genética que genera nuevos alelos en una población, pueden involucrar cambios ya sea en un solo nucleótido o en varios, en una parte de un gen o de un cromosoma, así como en un conjunto de cromosomas (Hedrick, 2011). La velocidad de las modificaciones dependerá de la magnitud de las tasas de mutación, las cuales en poblaciones naturales son generalmente bajas, que van de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$ , es decir un mutante cada  $10^5$  a  $10^8$  gametos o células, por lo que se le considera

un mecanismo lento que requiere de miles de años para provocar un pequeño cambio en las frecuencias alélicas (Eguiarte, 1999).

- ✚ **Deriva génica:** cambios aleatorios en las frecuencias alélicas como resultado de errores de muestreo inherentes en la transmisión de gametos, generación tras generación (Andrews, 2010; Hedrick, 2011). La deriva génica actúa tanto en poblaciones pequeñas como en grandes, sin embargo, en las pequeñas es donde los cambios en las frecuencias alélicas son más drásticos e impredecibles y ocurren con mayor rapidez (Eguiarte, 1999). El resultado de dichos cambios es la fijación o pérdida de un alelo, es decir la pérdida de variabilidad genética. En contraste, en las poblaciones grandes ocurren solo pequeños cambios en las frecuencias por cada generación (Hedrick, 2011).
- ✚ **Flujo génico:** movimiento de genes de una población a otra debido a la migración de los individuos, los cuales además logran reproducirse, o por el movimiento de gametos (Andrews, 2010). Cuando el proceso o flujo es alto y constante llega a aumentar el número de polimorfismos y con ello provocar la homogenización en la variación genética entre las diferentes poblaciones, por lo que evolucionarán de manera conjunta, pero si ocurre lo contrario la deriva génica, la selección y la mutación conducirán a una diferenciación genética, lo que contribuirá al aislamiento reproductivo, generando linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994; Aguirre, 2007; Hedrick, 2011).
- ✚ **Endogamia:** apareamientos no aleatorios en donde la probabilidad de que un individuo sea autóctigo, es decir con alelos idénticos por descendencia, es mucho más alta que para una población panmíctica (Moreno, 2007). Como resultado de la endogamia se da un incremento en la frecuencia de los homócigos y una disminución de los heterócigos, así como disminución en las tasas de reproducción y supervivencia cuanto más consanguíneos sean los apareamientos. El resultado final es la depresión endogámica que afectará negativamente la adecuación poblacional (Frankham, 2005). Lo anterior ocurre principalmente en poblaciones con una capacidad de dispersión o colonización reducida (Eguiarte, 1999), o bien por tamaños poblacionales pequeños.

### 1.3 Estimación de la variabilidad genética

Existen diferentes métodos para estimar la variación genética de una manera estandarizada, pero los más utilizados son la heterocigosidad esperada y observada, así como la diversidad nucleotídica (Hartl y Clark, 2006; Piñero, *et al.* 2008a; Hedrick, 2011)

✚ **Heterocigosidad:** indica la proporción de heterocigotos para un cierto locus o el promedio de éstos para varios loci, por lo que es el método más utilizado para calcular la variación genética en una población, debido a que los individuos de las especies diploides son tanto heterocigotos como homocigotos en ciertos loci. Ello representa una cuantificación biológicamente útil, que permite el cálculo tanto de la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) como la observada ( $H_O$ ) (Hedrick, 2011), a partir de las frecuencias genotípicas obtenidas de la población mediante la ecuación 2 descrita para estimar del EHW (Ortiz *et al.*, 2000). La  $H_E$  para un locus con  $n$  alelos puede ser calculada como:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

(Ecuación 3)

donde:  $H_E$  = heterocigosidad esperada

$P_i^2$  = frecuencia de homocigotos

En cuanto a la  $H_O$  en poblaciones panmícticas se espera que su valor sea similar a la  $H_E$  teórica. Sin embargo, en algunas poblaciones las frecuencias genotípicas pueden alejarse de las calculadas, debido a procesos como auto-fertilización o partenogénesis (Hedrick, 2011). Por lo que la  $H_O$  se puede calcular como:

$$H_O = \sum_{i < j}^n P_{ij}$$

(Ecuación 4)

donde:  $H_O$  = heterocigosidad observada

$P_{ij}$  = frecuencia de heterocigotos

✚ **Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ):** para la cuantificación de la diversidad utilizando secuencias es necesario calcular primero la cantidad de variación nucleotídica de una población, determinando la proporción de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (Hedrick, 2011), lo cual se cuantifica de la siguiente manera:

$$\pi = \sum_{ij} P_i P_j \pi_{ij}$$

(Ecuación 5)

donde:  $P_i$  = frecuencia de la secuencia  $i$

$P_j$  = frecuencia de la secuencia  $j$

$\pi$  = proporción de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias

Una vez obtenido este dato se podrá entonces estimar la diversidad nucleotídica mediante la siguiente fórmula:

$$\hat{\pi} = \frac{N}{N-1} \sum_{ij} P_i P_j \pi_{ij}$$

(Ecuación 6)

donde:  $P_i$  = proporción de las frecuencias  $i$  en la muestra

$P_j$  = proporción de las frecuencias  $j$  en la muestra

$N$  = total de secuencias analizadas

$\hat{\pi}$  = diversidad nucleotídica

## 1.4 Estructura genética

En la naturaleza a menudo las poblaciones se encuentran subdivididas en pequeñas unidades (sub-poblaciones), debido a factores ambientales, procesos geográficos o distintas historias de vida, entre otros (Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Cuando una población es subdividida, los apareamientos ya no se dan al azar y las subpoblaciones pueden diferenciarse (estructurarse), dado que el flujo génico dentro y entre las poblaciones disminuye (Hedrick, 2011). Asimismo, la selección natural y la deriva génica también tienen un papel importante en la estructura poblacional. Así, la estructura genética refleja el número de alelos intercambiados (Balloux y Lugon-Moulin, 2002), el grado de diferenciación y la distribución de la variación genética en las poblaciones (Hartl y Clark, 2006). Por lo tanto, determinar la estructura genética es importante para diferentes campos de la biología como: ecología, evolución o genética (Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Hedrick, 2005).

## 1.5 Estimación de la estructura genética

Existen diferentes métodos para estimar la estructura genética, los cuales se basan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas. Algunos métodos solo comparan estadísticamente tales variaciones, mientras que otros se basan en estimar la proporción de la variación genética dentro y entre las poblaciones (Piñero, *et al.* 2008a). Para el análisis se asume, en general, que los individuos forman poblaciones discretas en un modelo de islas (Rousset, 1997), o bien, que

forman poblaciones con una distribución continua bajo un modelo de aislamiento por distancia (Aguirre, 2007). Algunos de los índices para estimar estructura genética son:

✚ **Coefficientes de  $F$** : es uno de los métodos más utilizados, desarrollado por Wright (1951, 1965) para un modelo de un locus con dos alelos, basándose en la partición de la variación genética en una población subdividida para proporcionar una descripción clara de la diferenciación genética (Hedrick, 2000; Hedrick, 2011). Consiste de tres coeficientes usados para asignar la variabilidad genética a nivel poblacional ( $T$ ), sub-poblacional ( $S$ ) e individuos ( $I$ ) (Hedrick, 2000), denotados como:  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{IS}$ , respectivamente.

El primer componente es el índice de fijación ( $F_{ST}$ ), que es la correlación entre los genes de la sub-población y los de la población completa (Excoffier, 2001), lo que permite medir la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones y, por lo tanto, la diferenciación genética entre ellas (Aguirre, 2007); se calcula con la siguiente ecuación:

$$F_{ST} = \frac{(H_T - H_S)}{H_T}$$

(Ecuación 8)

donde:  $F_{ST}$  = diferenciación genética

$H_T$  = heterocigosidad esperada en el total de la población

$H_S$  = heterocigosidad esperada dentro de las sub-poblaciones

Cabe mencionar que los valores obtenidos de  $F_{ST}$  siempre serán positivos, y van de 0 a 1: si  $F_{ST} = 0$ , significa que no hay diferenciación y las frecuencias alélicas son iguales en todas las sub-poblaciones. Por el contrario, si  $F_{ST} = 1$ , las sub-poblaciones son totalmente diferentes, es decir, poseen todos los alelos diferentes (Hedrick, 2011).

Los componentes restantes,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ , son considerados medidas de desviación de las proporciones del EHW (Hamilton, 2009; Hedrick, 2011), donde  $F_{IS}$  se considera como la correlación entre los genes de los individuos dentro de las sub-poblaciones (Excoffier, 2001):

$$F_{IS} = \frac{(H_S - H_O)}{H_S}$$

(Ecuación 9)

donde:  $F_{IS}$  = coeficiente de endogamia

$H_O$  = heterocigosidad observada dentro de las sub-poblaciones

$H_T$  = heterocigosidad esperada en el total de la población

Mientras que  $F_{IT}$  es la correlación entre los genes de los individuos y los de la población total (Excoffier, 2001), expresándose de la siguiente manera:

$$F_{IT} = \frac{(H_T - H_O)}{H_T}$$

(Ecuación 10)

donde:  $F_{IT}$  = endogamia total

$H_T$  = heterocigosidad esperada en el total de la población

$H_S$  = heterocigosidad observada dentro de las sub-poblaciones

Finalmente, los valores positivos obtenidos con ambos coeficientes indican una deficiencia de heterocigotos y los valores negativos un exceso de éstos (Hedrick, 2000; Hedrick, 2011).

✚  **$G_{ST}$** : método análogo al  $F_{ST}$  llamado coeficiente de diferenciación genética (Nei, 1973), útil para medir los niveles de variación entre las sub-poblaciones, en relación con la variación de la población total, pero basado para un locus con alelos múltiples, suponiendo proporciones en EHW (Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Hedrick, 2005):

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

(Ecuación 11)

donde:  $G_{ST}$  = coeficiente de diferenciación genética

$H_S$  = promedio de la heterocigosidad de las sub-poblaciones en EHW

$H_T$  = heterocigosidad total de la población

A diferencia de  $F_{ST}$ , la magnitud de  $G_{ST}$  es particularmente dependiente de la cantidad de variación genética de los genes altamente variables, tales como los microsatélites. Por ello, los datos obtenidos con  $G_{ST}$  no van de 0 a 1 y pueden ser muy pequeños, incluso si las sub-poblaciones no comparten grupos de alelos (Hedrick, 2005).

✚  **$R_{ST}$** : modelo que es relativamente insensible a tasas de mutación y que se ajusta de mejor manera a loci que mutan de acuerdo al modelo *Stepwise mutational model* (SMM,

por sus siglas en inglés), tales como los microsatélites (Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Aguirre, 2007). Éste índice fue propuesto por Slatkin (1995) para resolver la problemática que presentaba el coeficiente  $F_{ST}$  con respecto a las altas tasas de mutación que presentan dichos marcadores, ya que tendían a disminuir los valores obtenidos de estructuración poblacional o bien sobrestimar el flujo génico (Hedrick, 1999); se define con la siguiente fórmula:

$$R_{ST} = \frac{S - S_w}{S}$$

(Ecuación 12)

donde:  $R_{ST}$  = varianza total del tamaño de los alelos que se encuentra entre las poblaciones

$S_w$  = varianza promedio del tamaño de alelos en cada población

$S$  = varianza estimada del tamaño del alelo en todas las poblaciones

Sin embargo, a pesar de las ventajas que tiene este estimador, se ha reportado que presenta una mayor varianza que otras medidas de diferenciación (Aguirre, 2007), además que en ocasiones se presenta homoplasia entre los diferentes loci.

## 1.6 Marcadores moleculares

Los diferentes marcadores son comúnmente clasificados en tres clases: los que se basan en la evaluación de características visibles (morfológicos), los basados en los productos de los genes (bioquímicos) y aquellos que se basan en fragmentos de ADN (moleculares) (Semagn, *et al.*, 2006). Por lo tanto, un marcador molecular es cualquier carácter genéticamente determinado, es decir una secuencia de ADN. En las últimas décadas han mostrado ser muy útiles para detectar el nivel de variación genética (Chenuil, 2006).

La elección del marcador molecular a utilizar debe considerar la pregunta que se pretende contestar, ya que existe gran variedad de marcadores moleculares, como los multilocus, tales como los de polimorfismo de ADN amplificados al azar (RAPDs), los de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) para animales y de cloroplasto en plantas (ADNcp), o bien aquellos marcadores de un solo locus como los microsatélites o regiones del ADN nuclear (ADNn), además de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Sunnucks, 2000).

Los marcadores multilocus son muy útiles para resolver diversas preguntas referentes a las poblaciones, pero han mostrado algunas desventajas: la variación que detectan puede ser no heredable, los datos son muy limitados para hacer comparaciones entre otros estudios, algunos presentan homologías y principalmente, la herencia dominante, la cual interfiere en la identificación de individuos heterocigotos. En contraste, los marcadores de un solo locus tienen herencia codominante, lo cual ayuda a la detección tanto de homocigotos como de heterocigotos, además que son más flexibles, informativos y los datos obtenidos son comparables (Sunnucks, 2000; Chenuil, 2006). No obstante los más usados en genética de poblaciones son el ADNmt, ADNcp y principalmente los microsatélites (Rentaría, 2007).

Los microsatélites son secuencias simples repetidas en tándem que están presentes tanto en la región codificadora como en la no codificadora del ADN; éstos han demostrado ser los marcadores más convenientes para estudios de poblaciones a nivel genético (Hedrick, 2011), debido a que se caracterizan por tener un alto polimorfismo y poder detectar una alta variabilidad ( $\mu=10^{-3}$ ) por generación. También, debido a su herencia codominante, se pueden calcular las frecuencias genotípicas y alélicas, lo que permite comparar las proporciones de heterocigotos y homocigotos observadas mediante las proporciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg y de esta forma, evaluar si la población se encuentra sujeta a un proceso evolutivo o no (Chenuil, 2006). Además, son muy efectivos para estimar la estructura poblacional ( $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ ), el flujo génico ( $Nm$ ), relaciones de endogamia ( $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ ), polimorfismo, diversidad alélica, número efectivo de alelos, tamaños poblacionales, cuellos de botella, pruebas de paternidad y consanguinidad, así como procesos de hibridación e introgresión (Selkoe y Toonen, 2006).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Los Crocodylidae en México

Los cocodrilos forman parte de la clase Reptilia y se les ubica en la subclase de los Archosauria, dentro del orden Crocodylia que está conformado por 24 especies, de las cuales se han dividido en tres familias con base en características morfológicas (Casas-Andreu *et al.*, 2013). Del total de especies 14 pertenecen a la familia Crocodylidae, ocho a la familia Alligatoridae y dos a la familia Gavialidae. En cuanto a su distribución, es común encontrarlos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, habitando ríos, costas, lagos y pantanos (McAliley *et al.*, 2006; Roos *et al.*, 2007; Sánchez, 2011; Casas-Andreu *et al.*, 2013).

Estos reptiles presentan cuerpos alargados y robustos, de cráneo alargado, hocico largo con mandíbulas fuertemente dentadas y cuello corto. En la parte posterior del cuerpo se extiende una cola gruesa y lateralmente comprimida, las extremidades son cortas pero fuertemente desarrolladas, presentando cinco dedos en las extremidades anteriores y cuatro en las posteriores. Asimismo, están recubiertos por una piel gruesa y queratinizada, y en la parte dorsal ostentan inclusiones óseas llamadas osteodermos. Cuentan con un paladar secundario completo, que presenta una válvula palatal que les permite respirar cuando tienen la boca llena de agua, de alimento o de ambas cosas (Alvarez del Toro, 1982; Casas-Andreu *et al.*, 2013).

En México se encuentran dos especies de cocodrilo de la familia Crocodylidae, que también son denominados del Nuevo Mundo, el americano (*Crocodylus acutus* Cuvier, 1807) y el de pantano (*C. moreletii* Dumèril y Bibron, 1851). Una hipótesis indica que estas especies se diversificaron de *C. niloticus* Laurenti, 1768 que migraron de África hacia América por el Atlántico (Meredith *et al.*, 2011), cuando está barrera oceánica era apenas de unos cientos de kilómetros en la época del Plioceno (Ford y Golonka, 2003; Brochu *et al.*, 2010).

Actualmente ambas especies se encuentran ampliamente distribuidas en México, por lo que el cocodrilo americano se distribuye por las costas este y norte de la península de Yucatán, así como en los ríos Grijalva y Usumacinta (Ernst *et al.*, 1999), por las costas del Pacífico desde el estado de Sinaloa, pasando por Nayarit, Jalisco, Colima, Oaxaca hasta llegar al estado de Chiapas, limitándose a las regiones cercanas al mar (Alvarez del Toro, 1974; Thorbjarnarson, 2010), además de los ríos El Santiago y Balsas (Casas-Andreu y Reyna, 1994). Se distribuyen en aguas continentales y estuarinas, lagunas costeras y manglares, así como cuerpos de agua dulce (Thorbjarnarson, 1989; Ross, 1998; Carvajal *et al.*, 2005). El cocodrilo de pantano se distribuye en las tierras bajas del Golfo de México, desde el norte de Tamaulipas pasando por

San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco hasta la península de Yucatán, así como en los estados de Oaxaca y Chiapas (Domínguez-Laso, 2006; Platt *et al.*, 2010). Habitan cuerpos de agua dulce como arroyos, pantanos, ciénagas, lagunas o humedales que se encuentran dentro de bosques y selvas, además de aguas salobres estancadas (Platt y Thorbjarnarson, 2000; Aguilar-Miguel, 2005a; Domínguez-Laso, 2006; Casas-Andreu *et al.*, 2013).

*C. acutus* se caracteriza por ser un reptil de gran tamaño, generalmente entre 3 y 4m, pero llegando alcanzar hasta los 7.5m. Las crías recién nacidas pueden alcanzar una longitud entre 25 a 30 cm. Poseen hocico alargado con cinco dientes premaxilares, 13 maxilares y 15 mandibulares, mientras que la sutura premaxilo-maxilar es de forma arqueada. El número de escudos postorbitales es de 2 a 4, en una hilera transversal, los nucales en un número mínimo de 4, en dos pares yuxtapuestos. La coloración dorsal es grisácea en los adultos y gris con tonos verdes en juveniles (Alvarez del Toro, 1982; Aguilar-Miguel, 2005b). Por otro lado, *C. moreletii* se distingue por ser de tamaño menor (3-3.5 m) y las crías al nacer entre 25 y 30 cm. Tienen hocico corto y redondeado en la punta, con cinco dientes premaxilares, 13 o 14 maxilares y 15 mandibulares, y una sutura premaxilo-maxilar más corta que el ancho sumado de los premaxilares. En el cuello tiene cuatro o más escudos postorbitales y seis o más nucales. La coloración de los adultos es pardo oscuro o negro y en los jóvenes es variable, por lo regular moteado de pardo y negro (Alvarez del Toro, 1982; Aguilar-Miguel, 2005a; Casas-Andreu *et al.*, 2013).

Se sabe que los cocodrilianos son carnívoros generalistas y que su alimentación sigue un patrón ontogénico, donde las crías y jóvenes consumen principalmente invertebrados terrestres y acuáticos, mientras que los adultos se alimentan a base de vertebrados (Casas-Andreu y Barrios-Quiroz, 2003; Casas-Andreu *et al.*, 2013). Alvarez del Toro (1982) reporta que las crías y jóvenes de *C. acutus* en Chiapas se alimentan de insectos acuáticos y caracoles, encontrando que en cocodrilos mayores a 1.2 m, la dieta se compone de insectos, peces, ranas, tortugas, aves y pequeños mamíferos. En cuanto a *C. moreletii* se ha reportado una ingesta de 26 diferentes tipos de presas, entre las que se encuentran cangrejos, peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos silvestres y domésticos (Pérez-Higareda *et al.*, 1989).

En cuanto a reproducción se conoce que la época reproductiva de *C. acutus* inicia con el cortejo en diciembre y enero, por lo que la anidación comienza a finales de febrero y se prolonga hasta principios de marzo; la eclosión de las crías se da de mayo a junio (Sigler, 2010). Por el contrario, en *C. moreletii*, el cortejo va de febrero a marzo, y la anidación comienza de marzo a junio, y la eclosión entre junio y septiembre (Casas-Andreu *et al.*, 2011;

Casas-Andreu *et al.*, 2013). Asimismo, el número promedio registrado de huevos por nido para *C. acutus* es de 27.9 y para *C. moreletii* de 30 (Aguilar-Miguel, 2005a; Aguilar-Miguel, 2005b).

## 2.2 Diversidad y estructura genética en cocodrilos

En los estudios sobre diversidad genética de estas especies de cocodrilos se han evaluado niveles de diversidad y estructura genética en poblaciones naturales, utilizando principalmente loci de microsatélites. Un ejemplo es el trabajo de Dever *et al.* (2002) con *C. moreletii* en el norte y centro de Belice, quienes encontraron altos niveles de heterocigosidad en distintas localidades, alta variación genética entre las localidades y sin evidencias de endogamia. En cuanto a estructuración, obtuvieron baja división entre localidades y concluyeron que existe movimiento frecuente de individuos entre éstas.

En cuanto a *C. acutus*, Cotroneo (2010) analizó cinco poblaciones a lo largo del Pacífico en las costas de Costa Rica y encontró que ninguna de éstas estaba en equilibrio, que presentaban valores moderados de endogamia y diferenciación significativa. Con ello concluyeron que a lo largo de las costas de Costa Rica, existe una metapoblación y no una población panmíctica.

Pacheco (2010) en la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, en Yucatán, analizó poblaciones de *C. moreletii* y encontró altos niveles de variación genética y observó que no existían procesos de endogamia, alto flujo génico y poca estructuración genética, dado un movimiento continuo de individuos dentro de las poblaciones. También en la península de Yucatán, Rodríguez *et al.* (2008) reportan una mayor variación genética (número promedio de alelos por locus y heterocigosidad) en *C. acutus* que en *C. moreletii* para las poblaciones analizadas en dicho trabajo.

Otro estudio realizado en la parte central de Veracruz con poblaciones de *C. moreletii* reporta una baja heterocigosidad, además de endogamia (González-Trujillo *et al.*, 2012); concluyen que el comportamiento territorial de esta especie, los requerimientos específicos en cuanto al hábitat y la falta de conectividad entre las diferentes poblaciones, podrían estar contribuyendo a la endogamia y a la subdivisión poblacional.

Lo que muestran estos pocos estudios existentes sobre las dos especies de cocodrilos es que por lo regular las poblaciones muestran tener valores altos de diversidad genética, así como ligeros niveles de estructuración. A pesar de ello, aún falta generar más información al respecto, ya que hay localidades dentro de la distribución de estas especies donde aún no se han evaluado genéticamente sus poblaciones. Tal es el caso del estado de Chiapas, región que

es de particular importancia por distintas razones: las poblaciones de ambas especies no son muy abundantes y se ha reportado la introducción de individuos de *C. acutus* en poblaciones de *C. moreletii* y viceversa, así como de otras especies de cocodrilo, principalmente, por una equivocada identificación (Domínguez-Laso *com. pers.*; Pacheco-Sierra *com. pers.*). Además, de que es uno de los dos estados donde también habita el caimán *Caiman crocodilus* Linnaeus, 1758 (Aguilar-Miguel, 2005c).

### **2.3 Evidencias de hibridación en cocodrilos**

La hibridación natural se define como la producción, en condiciones naturales, de descendencia a partir del entrecruzamiento de individuos pertenecientes a poblaciones diferenciadas en al menos un carácter heredable, independiente de su estatus taxonómico. Por lo tanto, las poblaciones naturales que, como consecuencia de este tipo de eventos, incluyen a individuos pertenecientes a ambas formas progenitoras, así como híbridos con diversas genealogías, se les considera como enjambres híbridos (Arnold, 1997; Gonzales, 2007). Además, la hibridación natural es más común de lo que se esperaría y está ampliamente identificada en distintos taxa. Incluso se ha documentado que este proceso puede suceder desde en pocas generaciones (Jahner *et al.*, 2011) hasta en millones de años (Gardner, 1997; Gardner y Wei, 2015).

El proceso de hibridación comienza cuando individuos no nativos entran en una población y se aparean con los individuos nativos de ésta, generando una distribución bimodal de genotipos, a pesar de ello la población estará conformada principalmente por individuos no mezclados y por muy pocos híbridos (Kalinowski y Powell, 2015). Sin embargo, si los híbridos producidos resultan fértiles y los mecanismos de aislamiento reproductivo son débiles, la hibridación puede continuar por varias generaciones, provocando al paso del tiempo eventos de introgresión en la población, es decir, un flujo constante de genes, como resultado de repetidos eventos de hibridación y retrocruzamiento (González, 2007; Kalinowski y Powell, 2015), lo cual llevará en algún punto a que toda la población sea híbrida y por lo tanto a una alta diferenciación con poblaciones de individuos no mezclados.

Las zonas híbridas naturales son consideradas como laboratorios, ya que resultan de gran interés, debido a que generan individuos recombinantes que proporcionan una oportunidad para mapear la arquitectura genética del aislamiento reproductivo (Gompert y Buerkle, 2009; Gompert y Buerkle, 2010). De esta manera, la recombinación, los individuos mezclados y los efectos en la adecuación de las combinaciones genotípicas permiten observar el grado de

introgresión entre las poblaciones involucradas (Gompert y Buerkle, 2010) y por tanto el proceso evolutivo de las especies.

En el caso de los cocodrilos, con el uso de marcadores genéticos se ha identificado que han ocurrido procesos de hibridación en poblaciones naturales y de cautiverio en diferentes especies, por ejemplo entre *C. siamensis* y *C. rhombifer* (FitzSimmons *et al.*, 2002) y entre *C. acutus* y *C. rhombifer* (Weaver *et al.*, 2008). Asimismo, también se ha encontrado evidencia de hibridación entre poblaciones de *C. acutus* y *C. moreletii*, con base en loci de microsatélites: Pacheco-Sierra (2010) analizó a 66 individuos de ambas especies de la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos y encontró un total de 18 individuos híbridos, nueve con mayor proporción hacia *C. moreletii* y nueve con mayor proporción hacia *C. acutus*, por lo que sugiere que la hibridación está ocurriendo de manera bidireccional.

El estudio de Rodríguez *et al.* (2008) en la península de Yucatán también reporta un 38.6% de hibridación en las poblaciones que analizaron, de una muestra de 83 cocodrilos de ambas especies, de los cuales la mayoría fueron clasificados como F<sub>2</sub>, es decir híbridos de segunda generación o más.

Finalmente, estos pocos trabajos indican que existen procesos de hibridación entre diferentes especies de cocodrilos en poblaciones naturales y de cautiverio, así como en zonas de simpatria (FitzSimmons *et al.*, 2002; Cedeño *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Weaver *et al.*, 2008; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2009; Pacheco-Sierra, 2010). Por lo cual, no se descarta que pueda estar sucediendo también en las poblaciones de Chiapas, ya que hay sitios como la Finca Santuario La Esperanza (Villa Flores) donde hubo introducción de individuos de las dos especies estudiadas en un cuerpo de agua artificial, pero principalmente de *C. moreletii*; o bien de manera accidental por una equivocada identificación, como en el Cañón del Sumidero, donde se han capturado individuos de *C. moreletii*, a pesar de ser una población que se caracteriza por la presencia de individuos de la especie *C. acutus* (Domínguez-Laso *com. pers.*; Pacheco-Sierra *com. pers.*). Por otro lado, hay poblaciones donde no se tiene información al respecto, como la del lago El Aguacate, conformada por individuos de *C. moreletii*. Por lo tanto, la información genética obtenida de este proceso (hibridación) en tales poblaciones es de suma utilidad para la identificación de híbridos, así como para plantear adecuadas propuestas de manejo y conservación.

### 3. Hipótesis

- Dado que las tres poblaciones analizadas están aisladas entre sí y el movimiento de individuos entre éstas debe ser escaso, se esperaría que estén genéticamente diferenciadas y muestren estructura genética significativa.
- Dado que en la población de Villa Flores ha existido introducción de individuos de ambas especies, se esperaría encontrar cierto nivel de hibridación, mientras que en las otras dos poblaciones predominarán individuos parentales.
- Si en la población de Villa Flores existe hibridación, ésta presentará niveles mayores de diversidad genética en comparación con las poblaciones del Cañón del Sumidero y El Aguacate, resultado de la presencia de alelos de ambas especies.

### 4. Objetivos

#### 4.1 General

- Estimar la variación y estructura genética de individuos de *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii* en tres poblaciones de Chiapas, con base en loci de microsatélites.

#### 4.2 Particulares

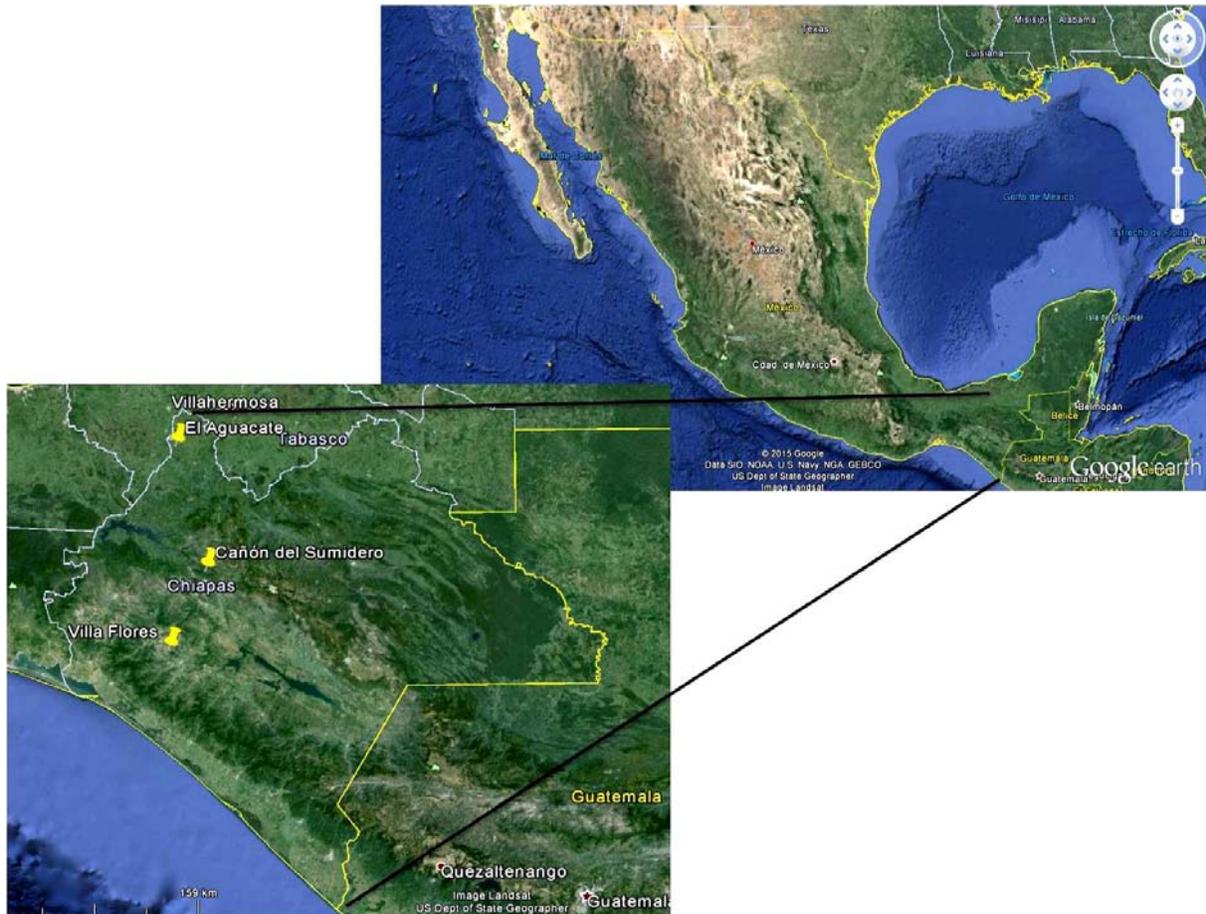
- Estimar la variación y la estructura genética dentro y entre poblaciones de *C. acutus* y *C. moreletii* en tres poblaciones de Chiapas.
- Determinar si con base en diferencias alélicas y genotípicas se puede diferenciar a los individuos de cada especie en las poblaciones analizadas de Chiapas.
- Determinar si existen procesos de hibridación e introgresión entre las dos especies en las poblaciones de Chiapas analizadas.
- Con base en los resultados obtenidos, hacer recomendaciones sobre manejo y conservación de estas tres poblaciones.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Áreas de estudio

El estudio se realizó en tres zonas del estado de Chiapas (Figura 1):

- 1) Finca Santuario La Esperanza, que se localiza en el municipio de Villa Flores (16° 18' 18.53" N, 93° 21' 56.01" O) a una altitud de 550 msnm, con vegetación predominante de selva baja y mediana caducifolia, así como subcaducifolia, además de pastizales naturales e inducidos (<http://laesperanzawildlife.com/finca-santuario-la-esperanza/>).
- 2) Parque Nacional Cañón del Sumidero, que se localiza entre los municipios de Tuxtla Gutiérrez, Chiapa de Corzo, Osumacinta, Soyaló y San Fernando (16° 44' a 16° 56' N, 93° 00' a 93° 11' O); la altitud varía de los 360 a 1720 msnm y la vegetación está conformada principalmente por selva baja caducifolia y bosque de galería (Pronatura-Chiapas, 2002; Sigler, 2010)
- 3) El lago El Aguacate, que se ubica en el municipio de Juárez (17° 42' 47.54" N, 93° 19' 49.32" O) a una altitud de 120 msnm, con una vegetación predominante de selva alta perennifolia y pastizales inducidos (INAFED, 2010).



**Figura 1.** Imagen de México y del estado de Chiapas, donde se muestran las poblaciones muestreadas (Mapas obtenidos de Google Earth, 2015).

## 5.2 Obtención de muestras y trabajo de campo

Todas las muestras de sangre y una parte de las de tejido utilizadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el Biól. Jerónimo Domínguez Laso y el M. en C. Gualberto Pacheco Sierra, las cuales fueron colectadas en diferentes monitoreos en los tres sitios de estudio: 21 muestras para Villa Flores, 15 del Cañón del Sumidero y 29 de El Aguacate.

Para el trabajo en campo, durante el mes de marzo de 2013 se capturaron, 10 cocodrilos de Villa Flores y 20 del Cañón del Sumidero. Así, junto con las muestras obtenidas de capturas previas, se obtuvo un total de 31 individuos de Villa Flores, 35 del Cañón del Sumidero y 29 de El Aguacate. El trampeo de individuos se realizó durante la noche desde una lancha: si los individuos eran menores de 1.5 m se atrapaban manualmente, cuando eran mayores a ésta longitud se capturaban con ayuda de bastones domadores con lazos de metal corredizos. A cada individuo capturado se le marcó con base en el patrón único de cortes de escamas

caudales (Domínguez-Laso *et al.*, 2011) y el tejido obtenido se conservó en tubos de 1.5 ml (Eppendorf®) con etanol al 96% para su procesamiento en el laboratorio (Anexo 1).

### 5.3 Trabajo de laboratorio

El ADN de los individuos capturados se extrajo con los kits QuickGene DNA Tissue Kit S Mini80 (FUJI FILM) y Quick-gDNA™ Tissue MiniPrep (Zymo Research) cuando las muestras eran de tejido; para las muestras de sangre se utilizó el kit Quick-gDNA™ Miniprep (Zymo Research) (Anexo 2). La concentración de ADN se observó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) teñido con bromuro de etidio (10g/mL) y visualizado con luz UV.

La amplificación de microsatélites se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando primers específicos para *Crocodylus* y marcados con fluorescencia: Cj16, Cj119, Cj35, Cj127, CUD68, CUJ131, Cj131, Cj109, Cj18, Cj128, Cj391 y Cj20 (Dever y Densmore, 2001, FitzSimmons *et al.*, 2002) (Anexo 3). El volumen de PCR fue de 7 y 10 µL dependiendo de las condiciones de amplificación para cada primer (Anexo 4); los primers que tenían las mismas condiciones, se amplificaron combinados de acuerdo con el tamaño de pares (pb) de cada uno, mientras que otros se hicieron individualmente (Anexo 5). Para descartar contaminación se utilizaron controles negativos en cada reacción. La genotipificación de los microsatélites se realizó con la Universidad de Illinois, EUA (UIUC, Core DNA Sequencing Facility), en un secuenciador capilar ABI Prism<sub>3730</sub>XL Analyzer (Applied Biosystems®). El genotipo de cada individuo se obtuvo con el programa GeneMarker V2.4.0 (SoftGenetics®). Para la identificación de los alelos en los cromatogramas se consideró el pico más alto como el alelo, siempre y cuando éste se encontrará dentro o cerca del rango de pb reportado para el locus. Debido a que los microsatélites son dinucleótidos, la designación de alelos se realizó en pares, por lo que el valor con decimales del tamaño de los alelos fue redondeado siguiendo una conversión para dinucleótidos (Matschiner y Salzburger, 2009; E. Vázquez-Domínguez *com. pers.*). Finalmente, en los casos donde no se obtenían amplificaciones óptimas se modificaron las concentraciones de ADN y las de Taq polimerasa durante la PCR (Anexo 4) hasta lograr la amplificación adecuada.

## 5.4 Análisis

### 5.4.1 Alelos nulos y *stuttering*

Para descartar los problemas de alelos nulos y *stuttering*, los cuales se pueden presentar cuando la amplificación en la PCR falla, ya sea porque las regiones de unión a los primers contienen mutaciones que inhiben dicha unión o por que las condiciones de ésta no son las adecuadas (Selkoe y Toonen, 2006), se utilizó el programa MICRO-CHEKER v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004 que detecta y permite corregir dichos errores de genotipificación al generar frecuencias alélicas que consideran los alelos nulos encontrados. Este análisis se hizo para cada locus por población, tomando en cuenta como población a cada localidad de muestreo, con un intervalo de confianza de 95% y 1000 aleatorizaciones.

### 5.4.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Se analizó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) entre los loci para cada población con el programa GenePop v4.3 (Rousset, 2008). Con el mismo análisis se obtuvo el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) con el método de Weir y Cockerham (1984), para cada locus por población, con el propósito de determinar el exceso o deficiencia de heterocigotos como una señal de la desviación del EHW. La significancia para cada locus se determinó con base en los datos obtenidos en una prueba exacta a partir del análisis de Cadenas de Markov (Guo y Thompson, 1992), implementando 10,000 demorizaciones, 1,000 “batches” y 10,000 iteraciones por “batch”. Debido a que el análisis realiza pruebas simultáneas, es necesario ajustar los valores de probabilidad ( $P \leq 0.05$ ) con la finalidad de no rechazar de manera incorrecta la hipótesis nula, lo cual se hizo por medio de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

Para evaluar el desequilibrio de ligamiento (DL) entre todas las combinaciones de pares de loci utilizados, se empleó el programa GenePop v4.3 (Rousset, 2008), tomando los mismos parámetros utilizados en la prueba del EWH.

### 5.4.3 Diversidad genética

Se utilizó el programa GenAlEx v.6.501 (Peakell y Smouse, 2012) para estimar los siguientes parámetros de diversidad genética para cada población: número observado de alelos ( $n_o$ ), número efectivo de alelos ( $n_e$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y la heterocigosidad de Nei ( $H_{NEI}$ ), la cual es una corrección que proporciona valores más

adecuados de diversidad cuando el tamaño de muestra es pequeño (Nei y Roychoudhury, 1974).

#### 5.4.4 Estructura y diferenciación genética

Para determinar la estructura genética dentro y entre las poblaciones, así como la asignación de individuos, se utilizó el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), dado que las tres poblaciones analizadas se encuentran aisladas y con limitado flujo génico entre ellas, se tomaron los siguientes parámetros: 1,000,000 de periodo burn-in, 500,000 de corridas de Cadenas de Markov, un modelo ancestral “*No Admixture Model*” y un modelo de frecuencias alélicas “*Allele Frequencies Independent*”; asimismo, se tomó una  $K$  de 3 y se realizaron 10 repeticiones independientes para dicho valor.

De manera complementaria se realizó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) con el programa GENETIXv4.0.5.2 (Belkhir *et al.*, 2004), con el propósito de obtener una representación gráfica de los diferentes genotipos y la pertenencia de cada individuo a una de las tres localidades muestreadas.

Se estimaron los estadísticos  $F$  para todos los loci y por locus (Weir y Cockerham, 1984) comparando las poblaciones de manera pareada con el programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995). Asimismo, se evaluó la estructura y diferenciación genética dentro y entre poblaciones con los estimadores  $F_{ST}$  (basado en el número de alelos diferentes entre las poblaciones) y  $R_{ST}$  (basado en las varianzas de los tamaños de los alelos), los cuales fueron calculados con el programa Arlequin v3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005). Cabe señalar que, aun cuando el índice  $R_{ST}$  ha mostrado ser el más adecuado para el análisis con microsatélites (Slatkin, 1995), éste puede dar datos erróneos cuando el tamaño de muestra y el número de loci analizados son pequeños, por lo que en estos casos es mejor sólo utilizar  $F_{ST}$  (Gaggiotti *et al.*, 1999); por ello se utilizaron ambos índices.

Para marcadores altamente variables, como los microsatélites, se han propuesto otros estadísticos como  $G'_{ST}$  y  $D_{EST}$ , que dependen de la tasa de mutación pero son insensibles a otros factores evolutivos que pudieran estar influyendo en los patrones de variación genética (Hedrick, 2005; Whitlock, 2011). El parámetro  $G'_{ST}$  se relaciona con la cantidad de variación dentro de las sub-poblaciones y de la población en conjunto (Hedrick, 2005), mientras que  $D_{EST}$  indica la proporción de diversidad alélica que se encuentra entre las sub-poblaciones, por lo que aumenta conforme incrementa la divergencia entre éstas (Jost, 2008; Whitlock, 2011). Por lo

tanto, éstos parámetros también fueron calculados utilizando el programa DEMETics (Gerlach *et al.*, 2010), el cual está incluido en la paquetería R.

Con el fin de determinar la distribución de la variación genética, se realizó una evaluación de niveles jerárquicos por medio del análisis molecular de varianza (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) empleando los parámetros  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  con 30,000 permutaciones. Dicho análisis emplea métodos permutacionales no paramétricos para conocer la distribución de la variación genética entre los diferentes niveles de agrupación (entre individuos, entre poblaciones y entre grupos de poblaciones), mediante la partición de la varianza en componentes de covarianza dados por las diferencias entre poblaciones y entre los individuos de la población.

Los valores obtenidos mediante el índice  $F_{ST}$  pueden ser sensibles a la presencia de alelos nulos. Por ello, se estimaron los valores de  $F_{ST}$  considerando alelos nulos con el programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007), el cual utiliza el algoritmo de corrección para alelos nulos denominado ENA; se compararon los resultados de  $F_{ST}$  con y sin el efecto de alelos nulos para todos los loci y por locus, mediante comparaciones pareadas entre poblaciones, empleando 10,000 réplicas de bootstrap. De igual forma, con el mismo programa se calculó la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), con y sin el efecto de los alelos nulos entre pares de localidades, con el cual se obtienen genotipos corregidos mediante el algoritmo INA (Chapuis y Estoup, 2007).

Para evaluar la diferenciación alélica y genotípica entre las poblaciones de cada sitio de muestreo, se realizó la prueba exacta de G (Goudet *et al.*, 1996) para la diferenciación por poblaciones pareadas por locus, y la prueba de Fisher (Raymond y Rousset, 1995) para todos los loci en conjunto, utilizando el programa GenePop v4.3. De la misma forma, se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni a los valores obtenidos.

#### 5.4.5 Hibridación e introgresión

El análisis para detectar individuos no mezclados e híbridos se realizó utilizando un método de Máxima Verosimilitud con el programa Introgress, que está incluido en la paquetería R (Gompert y Buerkle, 2010). Dicho análisis genera un índice de hibridación ( $h$ ), el cual es un estimado de la proporción de alelos que fueron heredados de una de las dos especies no mezcladas, por lo que una especie es designada como la referente y la otra como la alternativa. Por otra parte,  $h$  toma valores de 0 a 1, correspondiendo a los individuos no mezclados de la especie alternativa y referente, respectivamente; asimismo éste método maximiza los estimados

de  $h$  al definir intervalos de confianza al 95% (Buerkle, 2005). Por lo tanto, en el análisis a *C. acutus* se le consideró como la especie referente y a *C. moreletii* como la especie alternativa, de modo que, aquellos individuos que mostraron ser no mezclados, para su clara designación se tomaron en cuenta ciertos intervalos de confianza, de 0 a 0.2 en *C. moreletii* y de 0.8 a 1 en *C. acutus* (Pacheco-Sierra *et al.*, en revisión).

Para asignar la categoría (no mezclada o híbrida) a la que pertenecían los individuos de *C. moreletii* y *C. acutus* se utilizó el programa NewHybrids (Anderson y Thompson, 2002), el cual se basa en un método Bayesiano donde se calcula la probabilidad posterior del nivel de certeza de que un individuo pertenezca a una categoría híbrida o no. De esta manera, los individuos de una población pueden asignarse a una de las siguientes categorías:  $P_0$  o  $P_1$ , que se refieren a las especies no mezcladas;  $F_1$  o  $F_2$ , que hace referencia al número generacional de híbridos; o bien  $R_0$  o  $R_1$  que indican retrocruzas con alguna de las dos especies no mezcladas. Finalmente, los individuos que presentaron probabilidades posteriores por encima de 0.50 para una clase genotípica fueron asignados miembros para dicha clase (Rodríguez *et al.*, 2008).

Nuevamente con el programa Introgress, se calculó el nivel de introgresión de los genotipos entre los individuos de las dos especies mediante el método de clinas genómicas (Gompert y Buerkle; 2009; Gompert y Buerkle, 2010), el cual genera clinas consistentes a un modelo nulo de introgresión neutral y que sirven para estimar las desviaciones que hay entre el modelo nulo y las clinas genómicas generadas a partir de los genotipos obtenidos. Ello lo realiza tomando en cuenta el cambio en las frecuencias de los genotipos a lo largo de un gradiente de mezcla en el genoma analizado ( $h$ ), por lo que se puede predecir la probabilidad de que cierto genotipo resulte de la mezcla en la composición genética entre un par de especies, poblaciones divergentes o linajes híbridos (Gompert y Buerkle, 2009).

Debido a que el análisis con Introgress requiere datos genotípicos de las especies no mezcladas (parentales) para poder calcular los cambios en las frecuencias genotípicas con respecto a la población mezclada (Gompert y Buerkle, 2010), se incluyeron en el análisis 11 individuos identificados por Pacheco-Sierra *et al.* (en revisión) como genéticamente no mezclados para la especie *C. moreletii* de dos poblaciones de San Luis Potosí (Ciénega de Cabezas y Presa San Diego). Para el caso de individuos genéticamente identificados como no mezclados de *C. acutus*, inicialmente se trabajó con individuos de una población de Isla Cozumel (Pacheco-Sierra *et al.*, en revisión); sin embargo, al resultar con una alta diferenciación genética con respecto a los individuos del continente, se decidió tomar diez *C. acutus* del Cañón del Sumidero, con proporciones de mezcla menores a 0.05 ( $q_i$ ; datos no presentados).

## 6. Resultados

### 6.1 Número de individuos analizados genéticamente

Cabe mencionar que no se lograron amplificar todos los loci de microsatélites en nueve individuos de El Aguacate, uno del Cañón del Sumidero y uno de Villa Flores, por lo que genotipificados fueron 20, 34 y 30 muestras, respectivamente (Anexo 1).

### 6.2 Alelos nulos y “*stuttering*”

De los 12 microsatélites probados sólo se utilizaron 10, ya que dos resultaron monomórficos (CJ131 y CUJ131). A nivel de los sitios de muestreo, los loci analizados en El Aguacate no mostraron presencia de alelos nulos ni tartamudeos. En cuanto al Cañón del Sumidero seis loci (Cj20, CJ18, CJ35, Cj127, Cj16 y CJ119) presentaron alelos nulos y los tres últimos también mostraron señales de tartamudeos, mientras que Villa Flores los loci CJ35 y CJ127 tuvieron señal de alelos nulos.

### 6.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Los coeficientes de fijación ( $F_{IS}$ ) según el método de Weir y Cockerham mostraron valores entre -0.637 y 0.424 en la población de El Aguacate, pero solamente el locus CJ391 mostró una desviación significativa del EHW al mostrar un exceso de homócigos. Para el Cañón del Sumidero ( $F_{IS} = -0.369$  a  $0.883$ ) se observó que los loci CJ16, CJ119 y CJ127 tuvieron igualmente una desviación significativa del equilibrio, ya que mostraron una deficiencia de heterócigos, mientras que en Villa Flores ( $F_{IS} = -0.256$  a  $0.361$ ) sólo el locus Cj35 tuvo una desviación significativa del EHW al mostrar también un exceso de homócigos; en estos dos últimos casos puede estar asociado con la presencia de alelos nulos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Coeficiente de fijación ( $F_{IS}$ ) y valores de probabilidad ( $p$ ) de Weir y Cockerham para cada locus por población. Se muestra en gris los loci que presentaron alelos nulos.

Locus	El Aguacate		Cañón del Sumidero		Villa Flores	
	$F_{IS}$	$P$	$F_{IS}$	$P$	$F_{IS}$	$P$
CJ16	-0.1656	0.9076	0.1942	<b>0.0052*</b>	0.2007	0.0015
CJ119	0.3146	0.0248	0.6535	<b>0.0007*</b>	0.0169	0.0366
CJ127	0.1364	0.3615	0.4864	<b>0*</b>	0.3612	0.0284
CUD68	0.0788	0.2999	-0.3695	0.883	0.2105	0.2355
CJ35	-0.1515	1	0.5541	0.0088	1	<b>0.0001*</b>
CJ109	-0.0535	0.7172	0	0.5382	-0.1681	0.0308
CJ18	0.4242	0.0588	0.3615	0.054	-0.0798	1
CJ128	-0.4005	1	-0.1238	0.3106	-0.1382	0.0251
CJ391	0.1941	<b>0.0038*</b>	-0.0596	1	-0.2566	0.9685
CJ20	-0.6379	1	0.2752	0.1302	0.1812	0.02

\* $P \leq 0.05$ , con corrección de Bonferroni.

En la población de El Aguacate no se encontró desequilibrio de ligamiento (DL) significativo para ningún par de loci. Sin embargo, en la población del Cañón del Sumidero se observó DL significativo para 11 pares de loci (CJ119/CUD68, CJ16/CJ35, CJ127/CJ35, CUD68/CJ35, CJ16/CJ109, CJ127/CJ109, CUD68/CJ18, CJ35/CJ18, CJ109/CJ128, CJ127/CJ20 y CJ109/CJ20) y cuatro pares de loci en Villa Flores (CJ127/CJ35, CJ127/CJ18, CJ35/CJ18, CJ16/CJ20), por lo que estos loci no segregan de manera independiente en la recombinación genética. Cabe destacar que estos resultados fueron obtenidos para cada sitio de muestreo a partir de un total de 45 combinaciones posibles ( $P \leq 0.05$  con corrección secuencial de Bonferroni; Anexo 6).

#### 6.4 Diversidad genética

Los análisis de diversidad genética mostraron que de las tres poblaciones, el Cañón del Sumidero mostró un mayor número de alelos observados, seguido de Villa Flores y El Aguacate. En cuanto a los alelos efectivos, igualmente el Cañón del Sumidero fue donde se encontró el mayor número de alelos (2.6) y en el Aguacate el menor número (2.4). Además en el Cañón del Sumidero se observó el mayor número de alelos privados en seis loci diferentes y el menor en El Aguacate (Tabla 2).

Para los valores de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) promedio, Cañón del Sumidero presentó los valores menores (0.432 y 0.501), en comparación con El Aguacate (0.565 y 0.538), y Villa Flores (0.510 y 0.543). Lo cual también se observó con los valores de heterocigosidad esperada de  $N_{EI}$  ( $H_{NEI}$ ) (Tabla 2).

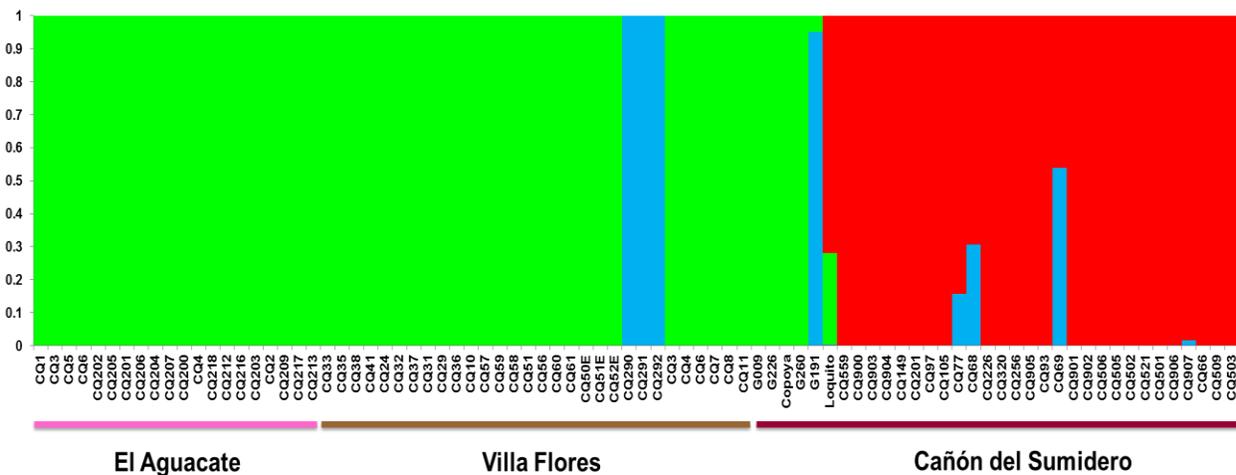
**Tabla 2.** Valores de diversidad genética por locus para las tres poblaciones de cocodrilo analizadas.

Población	Locus	N	$n_a$	$n_e$	Ae	$H_o$	$H_e$	$H_{NEI}$
El Aguacate	CJ16	20	2.000	1.724	0	0.500	0.420	0.431
	CJ119	20	3.000	2.740	0	0.450	0.635	0.651
	CJ127	20	5.000	1.818	1	0.400	0.450	0.462
	CUD68	20	4.000	2.730	1	0.600	0.634	0.650
	CJ35	20	3.000	1.515	0	0.400	0.340	0.349
	CJ109	20	3.000	2.847	0	0.700	0.649	0.665
	CJ18	20	3.000	1.504	0	0.200	0.335	0.344
	CJ128	20	4.000	2.116	0	0.750	0.528	0.541
	CJ391	20	8.000	4.598	3	0.650	0.783	0.803
	CJ20	20	6.000	2.532	0	1.000	0.605	0.621
	<b>Media</b>	<b>20</b>	<b>4.100</b>	<b>2.412</b>	<b>0.5</b>	<b>0.565</b>	<b>0.538</b>	<b>0.552</b>
<b>SE</b>	<b>0</b>	<b>0.567</b>	<b>0.293</b>	<b>0.217</b>	<b>0.071</b>	<b>0.047</b>	<b>0.048</b>	
Cañón del Sumidero	CJ16	34	8.000	4.000	3	0.588	0.750	0.761
	CJ119	34	4.000	1.199	0	0.059	0.166	0.168
	CJ127	34	9.000	2.919	4	0.324	0.657	0.667
	CUD68	34	4.000	2.938	0	0.912	0.660	0.669
	CJ35	34	3.000	1.475	0	0.147	0.322	0.327
	CJ109	34	4.000	1.353	1	0.265	0.261	0.265
	CJ18	34	7.000	2.061	4	0.353	0.515	0.522
	CJ128	34	12.000	6.663	5	0.971	0.850	0.863
	CJ391	34	4.000	1.237	0	0.206	0.192	0.194
	CJ20	34	7.000	2.714	1	0.441	0.631	0.641
	<b>Media</b>	<b>34</b>	<b>6.200</b>	<b>2.682</b>	<b>1.8</b>	<b>0.432</b>	<b>0.501</b>	<b>0.509</b>
<b>SE</b>	<b>0</b>	<b>0.917</b>	<b>0.546</b>	<b>0.341</b>	<b>0.099</b>	<b>0.079</b>	<b>0.080</b>	
Villa Flores	CJ16	30	6.000	2.889	1	0.533	0.654	0.665
	CJ119	30	7.000	3.333	3	0.700	0.700	0.712
	CJ127	30	6.000	2.041	1	0.333	0.510	0.519
	CUD68	30	5.000	2.635	1	0.500	0.621	0.631
	CJ35	30	2.000	1.220	0	0.000	0.180	0.183
	CJ109	30	5.000	2.835	2	0.767	0.647	0.658
	CJ18	30	3.000	1.270	0	0.233	0.213	0.216
	CJ128	30	9.000	3.255	1	0.800	0.693	0.705
	CJ391	30	5.000	1.991	1	0.633	0.498	0.506
	CJ20	30	6.000	3.550	0	0.600	0.718	0.731
	<b>Media</b>	<b>30</b>	<b>5.400</b>	<b>2.502</b>	<b>1</b>	<b>0.510</b>	<b>0.543</b>	<b>0.553</b>
<b>SE</b>	<b>0</b>	<b>0.618</b>	<b>0.264</b>	<b>0.172</b>	<b>0.080</b>	<b>0.062</b>	<b>0.064</b>	

N = tamaño de muestra,  $n_a$  = alelos observados,  $n_e$  = alelos efectivos, Ae = número de alelos privados,  $H_o$  = heterocigosidad observada,  $H_e$  = heterocigosidad esperada,  $H_{NEI}$  = heterocigosidad esperada de Nei, SE = error estándar.

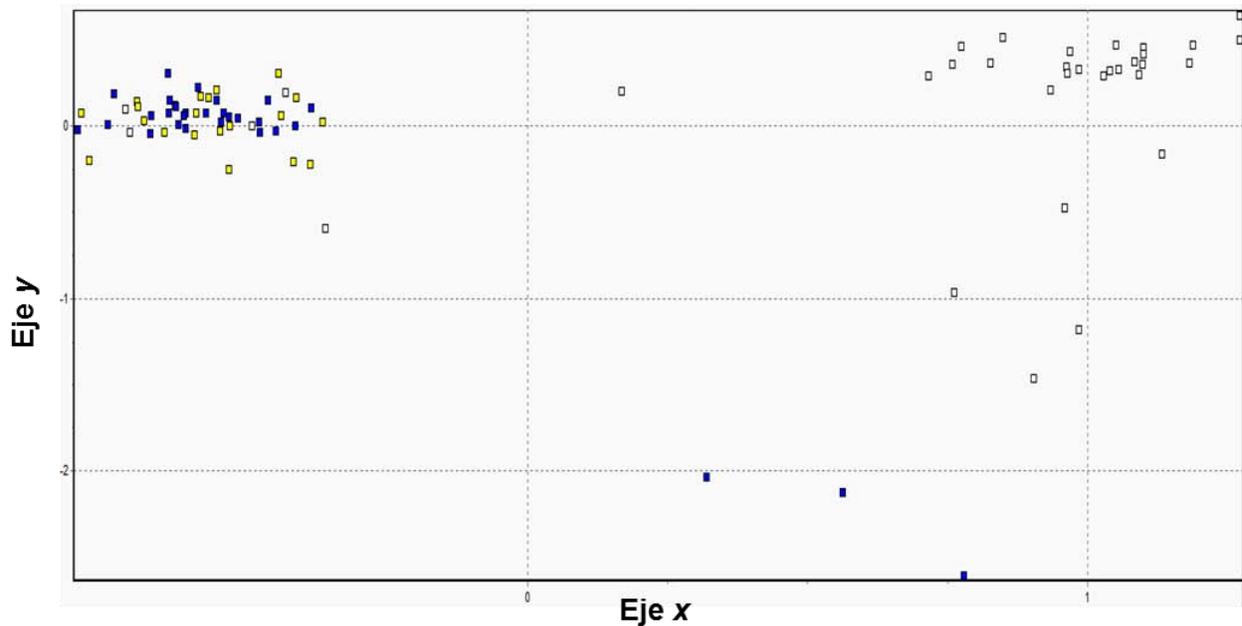
## 6.5 Estructura y diferenciación genética

Con el análisis de STRUCTURE ( $\Delta = -1814.3$ ; Figura 2) se asignaron a los individuos de El Aguacate y de Villa Flores a una misma población (verde), lo cual puede deberse a similitudes genéticas al tratarse de poblaciones de la misma especie, es decir, *C. moreletii*. En cuanto al Cañón del Sumidero, ésta fue asignada como una población diferente, debido a que ésta se encuentra conformada principalmente por *C. acutus* (rojo); sin embargo algunos individuos (G009, G226, Copoya y G260) fueron asignados como individuos pertenecientes a las poblaciones de *C. moreletii* (verde). Cabe resaltar que algunos cocodrilos de Villa Flores (CQ290, CQ291 y CQ292), así como del Cañón del Sumidero (G191 y CQ69) fueron asignados con proporciones altas a una población diferente a las anteriores (azul).



**Figura 2.** Proporciones de pertenencia genética para *C. moreletii* y *C. acutus*. En el eje “x” están señalados los individuos analizados, además de las poblaciones donde se capturó a cada uno de estos. El eje “y” representa el porcentaje de pertenencia de cada individuo.

El Análisis Factorial de Correspondencia también mostró que los cocodrilos de El Aguacate y Villa Flores son agrupados cercanamente. Por otro lado, los individuos del Cañón del Sumidero, igualmente, se separan de estas dos poblaciones; asimismo se observa como algunos individuos de esta población son agrupados con *C. moreletii*. Del mismo modo, hay individuos de Villa Flores y Cañón del Sumidero que se agrupan como en el análisis realizado con STRUCTURE, como si se tratara de una diferente población con características genéticas distintas a las dos especies (Figura 3).



**Figura 3.** Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) de las poblaciones de cocodrilo analizadas. Los cuadros amarillos representan a los individuos de El Aguacate, los azules de Villa Flores y los blancos del Cañón del Sumidero. El Eje “x” explica el 13.34% de varianza y el Eje “y” el 7%.

Con los coeficientes  $F$  las comparaciones pareadas entre El Aguacate y el Cañón del Sumidero mostraron un valor de  $F_{IT}$  considerando todos los loci de 0.382 y el de  $F_{IS}$  de 0.083, lo que indica que hay un déficit de heterócigos (Anexo 7), mientras que  $F_{ST}$  fue de 0.326 (Tabla 3). Lo observado entre Villa Flores y Cañón del Sumidero y entre Villa Flores y El Aguacate fueron valores similares con evidencia de déficit de heterócigos, y un  $F_{ST}$  de 0.293 para el primer caso y el valor más bajo de  $F_{ST}$  (0.033) para la segunda comparación. De tal forma que la mayor diferenciación nuevamente se observa entre Cañón del Sumidero y las otras dos poblaciones (Tabla 3).

Los valores con  $G'_{ST}$  y  $D_{Est}$ , similar a lo encontrado con  $F_{ST}$ , mostraron que las poblaciones de El Aguacate y el Cañón del Sumidero presentaron la mayor diferenciación genética (0.198 y 0.538, respectivamente), seguido de las poblaciones de Cañón del Sumidero y Villa Flores, ( $G'_{ST} = 0.182$ ;  $D_{Est} = 0.480$ ), mientras que Villa Flores y El Aguacate mostraron la menor diferenciación genética (0.015 y 0.052) (Tabla 3). Lo cual también se observó en cada locus (Anexo 8).

**Tabla 3.** Estadísticos  $F_{ST}$ ,  $G'_{ST}$  y  $D_{Est}$  obtenidos para todos los loci.

	Comparaciones								
	El Aguacate y Cañón del Sumidero			Villa Flores y El Aguacate			Cañón del Sumidero y Villa Flores		
	$F_{ST}$	$G'_{ST}$	$D_{Est}$	$F_{ST}$	$G'_{ST}$	$D_{Est}$	$F_{ST}$	$G'_{ST}$	$D_{Est}$
Todos los loci	<b>0.325</b>	<b>0.198</b>	<b>0.538</b>	<b>0.033</b>	<b>0.015</b>	<b>0.052</b>	<b>0.292</b>	<b>0.182</b>	<b>0.480</b>
IC (95%)	0.224- 0.438	0.193- 0.205	0.516- 0.568	0.012- 0.054	0.010- 0.022	0.037- 0.074	0.169- 0.451	0.178- 0.189	0.460- 0.505

En negritas se muestran los valores significativos ( $P \leq 0.05$ ). IC = intervalos de confianza.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), con base en los estimadores  $F_{ST}$  mostró que el 69.01% de la variación genética se encuentra dentro de los individuos, mientras que el 24.87% de ésta se encuentra entre poblaciones (grupos) y el 6.12% entre los individuos dentro de las poblaciones (Tabla 4a). Los resultados obtenidos con el coeficiente  $R_{ST}$  fueron similares, obteniendo porcentajes de 71.77% y 34.77% para dentro de los individuos y entre poblaciones, respectivamente (Tabla 4b),

**Tabla 4.** AMOVA basado en los valores estimados de  $F_{ST}$  (a) y  $R_{ST}$  (b).

Fuente de variación	Grados de libertad (g. l.)	Suma de cuadrados	Componentes de la variación	Porcentaje de variación (%)	$P$
<b>(a)</b>					
Entre poblaciones (grupos)	2	102.841	0.88614	24.87	<b>0.000*</b>
Entre individuos dentro de las poblaciones	81	234.432	0.21795	6.12	<b>0.000*</b>
Dentro de los individuos	84	206.500	2.45833	69.01	<b>0.000*</b>
Total	167	543.774	3.56242	100	
<b>(b)</b>					
Entre poblaciones (grupos)	2	37102.951	328.63575	34.76	<b>0.000*</b>
Entre individuos dentro de las poblaciones	81	44935.216	-61.82451	-6.54	0.982
Dentro de los individuos	84	56986.000	678.40476	71.77	<b>0.001*</b>
Total	167	139024.167	945.21601	100	

Los valores calculados para todos los loci mediante el coeficiente  $F_{ST}$  con la corrección ENA para alelos nulos, concordaron con los datos obtenidos por el método de Weir y Cockerham (1984): ambos mostraron que las poblaciones El Aguacate y Villa Flores tienen una mayor diferenciación con respecto al Cañón del Sumidero y muy poca entre ellas (Tabla 5); sin embargo, también se observó que con esta corrección, un menor número de loci mostraron diferenciación genética significativa (Anexo 9). Se observó el mismo patrón con las distancias genéticas de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), tanto para todos los loci (Tabla 6) como por locus (Anexo 10), la cual emplea la corrección INA para alelos nulos.

**Tabla 5.** Coeficiente  $F_{ST}$  para todos los loci con y sin corrección ENA para alelos nulos.

	Comparaciones					
	El Aguacate y Cañón del Sumidero		Villa Flores y El Aguacate		Cañón del Sumidero y Villa Flores	
	$F_{ST}$ (s/c)	$F_{ST}$ (c)	$F_{ST}$ (s/c)	$F_{ST}$ (c)	$F_{ST}$ (s/c)	$F_{ST}$ (c)
Todos los loci	0.325	0.31	0.032	0.035	0.292	0.264
IC (95%)	0.246- 0.408	0.237- 0.386	0.016- 0.048	0.019- 0.054	0.188- 0.406	0.172- 0.366

s/c = sin corrección, c = con corrección, IC = Intervalo de confianza.

**Tabla 6.** Distancias genéticas pareadas de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) (D) para todos los loci con y sin corrección INA para alelos nulos.

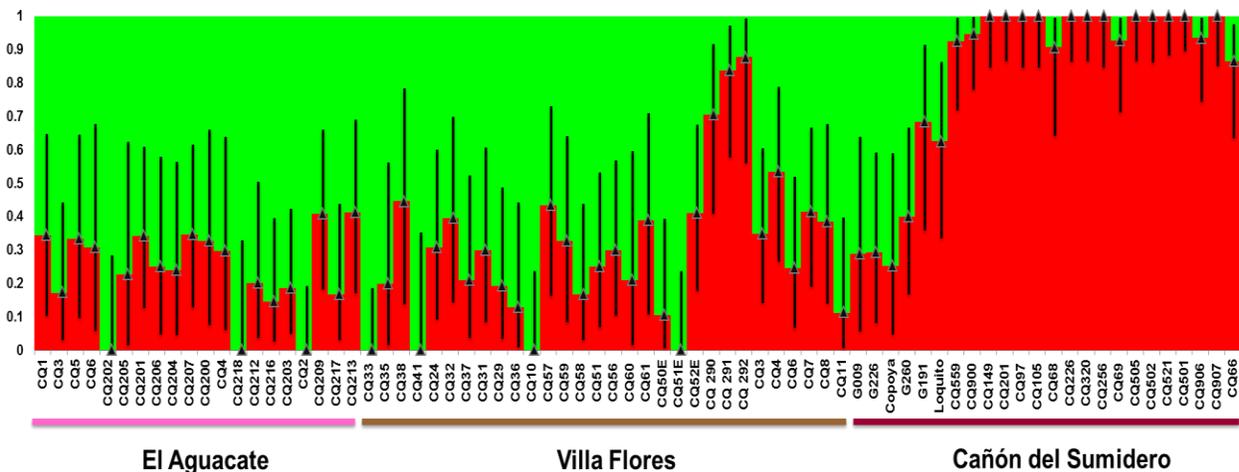
	Comparaciones					
	El Aguacate y Cañón del Sumidero		Villa Flores y El Aguacate		Cañón del Sumidero y Villa Flores	
	D (s/c)	D (c)	D (s/c)	D (c)	D (s/c)	D (c)
Todos los loci	0.523	0.535	0.286	0.323	0.480	0.474
IC (95%)	0.452- 0.597	0.462- 0.609	0.252- 0.327	0.291- 0.358	0.409-0.551	0.409-0.539

s/c = sin corrección, c = con corrección, IC = Intervalo de confianza.

El análisis de diferenciación alélica y genotípica mostró que para la comparación entre Cañón del Sumidero, ya sea con El Aguacate o Villa Flores, fueron significativas para todos los loci, mientras que entre éstas dos últimas sólo dos loci fueron significativos. El mismo patrón se observó cuando se realizó el análisis considerando todos los loci en conjunto (Anexo 11). Esto indica que hay una clara diferenciación genética entre las dos especies en las poblaciones analizadas.

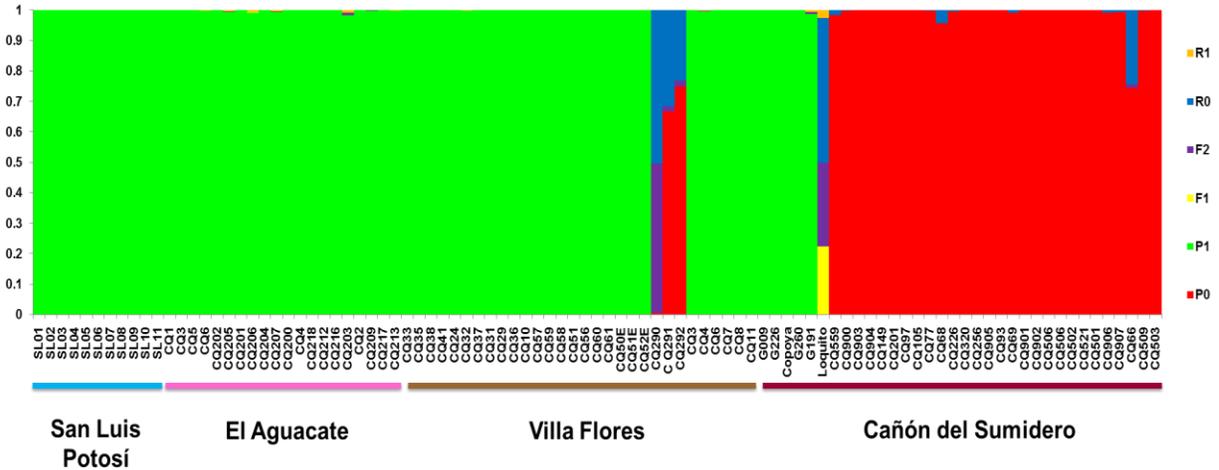
## 6.6 Hibridación e introgresión

El índice de hibridación mostró que la mayoría de los individuos de la población de El Aguacate y Villa Flores, ambas de *C. moreletii* (especie alternativa), comparten cierta proporción genética con *C. acutus* (especie referente), por lo que se les consideró como híbridos; por otra parte, sólo un individuo de cada población (CQ2 y CQ33, respectivamente) fue identificado como no mezclado. Para el Cañón del Sumidero varios individuos fueron identificados como no mezclados para *C. acutus*; sin embargo algunos tuvieron mayores proporciones genéticas para *C. moreletii* (G009, G226, Copoya, G260, G191 y Loquito), mientras que otros cocodrilos mostraron compartir bajas proporciones con ésta especie (Figura 4; Anexo 12).



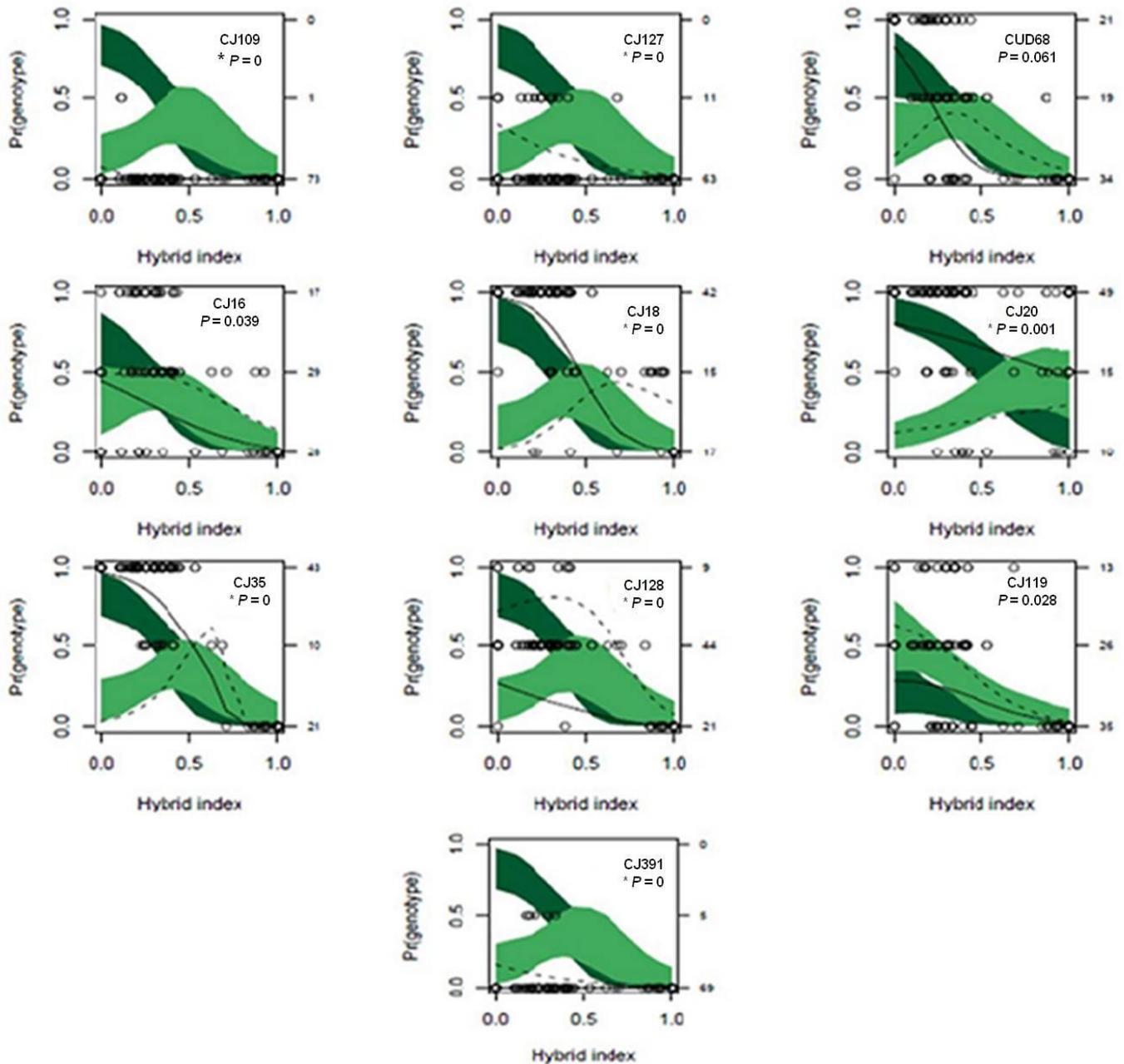
**Figura 4.** Representación gráfica del índice de hibridación. El eje “x” indica los individuos analizados de cada poblaciones y el eje “y” muestra el índice de hibridación ( $h$ ). Las líneas verticales negras indican los intervalos de confianza para cada cocodrilo.

La asignación de los individuos con NewHybrids situó a muy pocos en una clasificación híbrida, por lo que la mayoría de los cocodrilos de El Aguacate y Villa Flores fueron categorizados como no mezclado de *C. moreletii*, aunque en Villa Flores dos individuos se clasificaron como *C. acutus* y otro más como una retrocruza con *C. acutus*. Para el Cañón del Sumidero cinco cocodrilos fueron clasificados como no mezclados para *C. moreletii* y otro más como una retrocruza con *C. acutus* (Figura 5; Anexo 13). También en el análisis se incluyeron los datos de los individuos no mezclados de *C. moreletii* de las dos poblaciones de San Luis Potosí, con la finalidad de corroborar la categorización de estos.

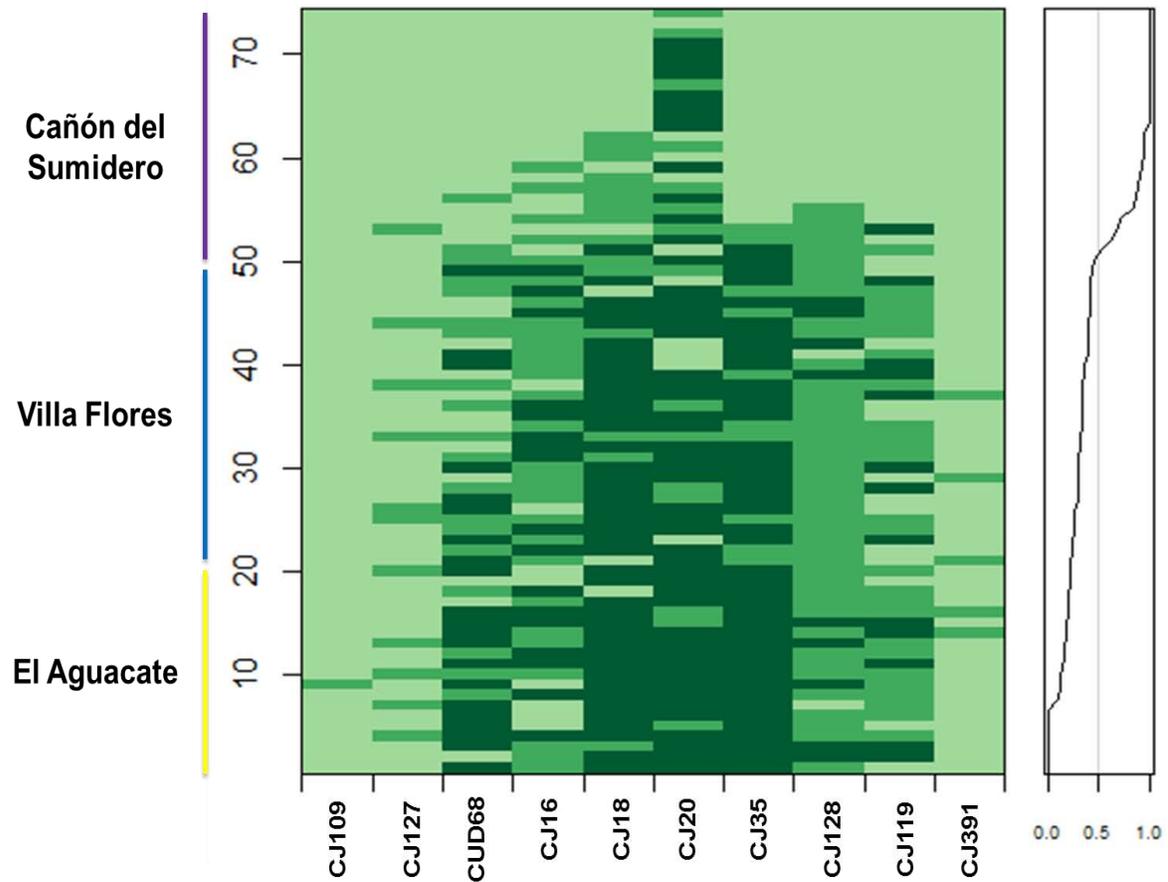


**Figura 5.** Asignación de la clasificación híbrida. En el eje “x” se muestra cada uno de los individuos de las poblaciones analizadas. En el “y” se indican las frecuencias genotípicas de las diferentes categorías. *C. acutus* (P0), *C. moreletii* (P1), híbridos F<sub>1</sub> (F1), híbridos F<sub>2</sub> (F2), retrocruza con *C. acutus* (R0) y retrocruza con *C. moreletii* (R1).

De los 10 loci utilizados en el análisis de clinas genómicas, siete se desviaron significativamente de las clinas esperadas bajo el modelo neutral (Figura 6;  $P > 0.05$ ); sin embargo ninguno mostró patrones útiles para identificar introgresión, esto debido al exceso de homocigotos identificados para ambas especies. A pesar de ello, se pudo observar que en algunos loci hubo una gran presencia de heterocigotos, además de homocigotos (Figura 7), no obstante los datos de estos se deben de tomar con precaución al no ser constantes, por lo que no se puede indicar de manera precisa el grado de introgresión en estos loci. Por otro lado, este método además de analizar el patrón de introgresión también sirve para observar si los loci se encuentran bajo la acción de algún tipo de selección natural (Gompert y Buerkle, 2009); sin embargo las desviaciones encontradas en las clinas no muestran evidencia consistente de que algún locus se encuentre bajo selección natural (Figura 6).



**Figura 6.** Clinas genómicas de los 10 loci de microsatélites utilizados para el análisis. El nombre del locus y el valor de  $P$  se muestran para cada grafica ( $*P < 0.05$ ). Valores del índice de hibridación de cero corresponden a individuos no mezclados para *C. moreletii*, mientras que valores de 1 indican individuos no mezclados de *C. acutus*. Se muestran los intervalos de confianza al 95% de los homocigotos esperados de *C. moreletii* (verde oscuro) y de los heterocigotos esperados (verde claro). La línea sólida hace referencia a los homocigotos observados de *C. moreletii* y la línea punteada a los heterocigotos observados. Los círculos indican los datos genotípicos observados e ilustran la relación entre el índice de hibridación y las tres clases genotípicas: homocigotos de *C. moreletii* (arriba), heterocigotos (en medio) y homocigotos de *C. acutus* (abajo).



**Figura 7.** Patrones de introgresión para todos los loci (eje x) e individuos de las poblaciones analizadas (eje y). Cada rectángulo denota un genotipo de un individuo para un locus: homocigoto de *C. moreletii* (verde oscuro), heterocigoto (verde intermedio) y homocigotos de *C. acutus* (verde claro). El grafico a la derecha muestra la proporción del genoma heredado de la especie referente (*C. acutus*) a cada individuo (*h*).

## 7. Discusión

El presente estudio es el primero que analiza la diversidad, estructura genética y niveles de hibridación de *C. moreletii* y *C. acutus* en el estado de Chiapas, con base en loci de microsatélites. Asimismo, las poblaciones estudiadas representan un modelo ideal de estudio, dado que permitieron corroborar la predicción de que albergaban individuos genéticamente reconocibles como especies no mezcladas, permitiendo identificar híbridos con gran certeza.

### 7.1 Diversidad y estructuración genética

La variabilidad genética de las poblaciones estudiadas mostró valores más altos de Heterocigosidad (El Aguacate:  $H_o = 0.565$  y  $H_e = 0.538$ ; Villaflores:  $H_o = 0.510$  y  $H_e = 0.543$ ) pero similares en cuanto al número promedio de alelos ( $n_a = 4.1$  y  $5.4$ , respectivamente) en comparación con lo registrado para *C. moreletii* por Rodríguez *et al.* (2008) en la península de Yucatán ( $H_o = 0.31$  y  $H_e = 0.39$ ;  $n_a = 4.1$ ) y por González-Trujillo *et al.* (2012) en el centro de Veracruz ( $H_o = 0.32$  y  $H_e = 0.44$ ;  $n_a = 3.6$ ). Por otro lado, Pacheco-Sierra (2010) reporta valores más altos de heterocigosidad y de número promedio de alelos para la misma especie ( $H_o = 0.900-1.000$  y  $H_e = 0.657-0.763$ ;  $n_a = 4.4-11$ ), ello en poblaciones ubicadas en la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, Yucatán. Por otro lado, *C. acutus* mostró valores ligeramente menores de heterocigosidad, pero mayores en cuanto a número promedio de alelos ( $H_o = 0.426$ ,  $H_e = 0.500$  y  $n_a = 6.2$ ) respecto a lo reportado por Weaver *et al.* (2008) en poblaciones de cautiverio en Cuba ( $H_o = 0.49$  y  $H_e = 0.57$ ;  $n_a = 4$ ) y por Rodríguez *et al.* (2008) en la península de Yucatán ( $H_o = 0.51$  y  $H_e = 0.59$ ;  $n_a = 4.5$ ). De esta manera, se aprecia que las poblaciones analizadas de *C. acutus* y *C. moreletii* de Chiapas, aunque habitan cuerpos de agua relativamente confinados, los niveles de diversidad genética son similares a lo reportado para las dos especies en otras regiones y hábitats.

Los análisis de estructuración mostraron que las poblaciones de *C. moreletii* tienen una alta diferenciación con respecto a la de *C. acutus*. Del mismo modo, con los estadísticos evaluados ( $F_{ST}$ ,  $G'_{ST}$  y  $D_{Est}$ ) se confirma la alta estructuración genética entre estas especies, en concordancia con los valores de distancia genética. Es más, las estimaciones con y sin corrección para alelos nulos fueron similares y los análisis de diferenciación genotípica y alélica indican que cada especie mantiene composiciones genéticas únicas.

Como se observó, El Aguacate y el Cañón del Sumidero registraron los valores más altos de diferenciación y distancia genética (0.311 y 0.535, respectivamente), lo cual concuerda con lo reportado por Rodríguez *et al.* (2008), quienes encontraron una separación profunda entre los individuos de ambas especies (analizadas por medio de un árbol de neighbor-joining basado en las distancias pareadas); Cedeño-Vázquez (2008) reporta el mismo patrón para las dos especies utilizando datos de ADN mitocondrial. El mismo escenario se encontró entre Villa Flores y Cañón del Sumidero, pero con valores menores de  $F_{ST}$  (0.264) y de distancia genética (0.474) en comparación con lo obtenido comparando El Aguacate.

Los datos también mostraron que El Aguacate y Villa Flores tienen una baja diferenciación, indicando que pertenecen a una misma; sin embargo, esto no podría ser posible por la amplia distancia que existe una de otra, dificultando así el movimiento y flujo génico entre estas. Dichas similitudes podrían explicarse si se toma en cuenta que estos cocodrilos comparten proporciones genéticas al ser la misma especie (*C. moreletii*), por lo que se estarán más cercanos genéticamente. Por lo tanto, las tres poblaciones fueron consideradas como distintas, sólo geográficamente hablando. Cabe resaltar, que dicha diferenciación entre estas poblaciones es mayor que la reportada por Pacheco-Sierra (2010) para la misma especie en las poblaciones de la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que hay movimiento de individuos y flujo génico entre las poblaciones de la reserva, mientras que entre El Aguacate y Villa Flores muy difícilmente podría haberlo.

Hay que tomar en cuenta que Villa Flores no es una población natural, por lo que los cocodrilos que la conforman fueron introducidos; asimismo se encuentra rodeada en su mayoría de grandes extensiones de potreros y pastizales. Por otro lado, la población de Cañón del Sumidero quedó relativamente aislada después de la construcción de la Presa Hidroeléctrica Manuel Moreno Torres ("Chicoasén"), con lo que se interrumpió en su mayoría la migración con otras poblaciones ubicadas río abajo después de la cortina de la presa (Sigler, 2010). Así, aunque se conoce que los cocodrilos son animales que pueden desplazarse distancias largas, ya sea por medio acuático o terrestre (Vasconcelos *et al.*, 2006; Pacheco-Sierra, 2010) en busca de hembras para aparearse, como mecanismo para evitar la competencia antes del apareamiento, o para la búsqueda de mejores sitios de anidamiento donde haya alimento (hembras; Tucker *et al.*, 1998), ello es poco probable que ocurra entre Villa Flores y Cañón del Sumidero, dado el aislamiento (distancia) considerable entre éstas y por las barreras geográficas presentes en las localidades donde habitan. En cuanto a la población de El Aguacate, tampoco es factible el movimiento de individuos con las otras dos, pero sí con

poblaciones cercanas de *C. moreletii*, ubicadas en El Caracol y en el Arroyo San Vicente (CONABIO, 2011).

## 7.2 Hibridación en las poblaciones de Chiapas estudiadas

En los últimos años se ha comprobado que ocurren eventos de hibridación en diferentes especies de cocodrilo, tanto de manera natural como en poblaciones en cautiverio (FitzSimmons *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2004; Cedeño-Vázquez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Weaver *et al.*, 2008; Pacheco-Sierra, 2010). Lo cual se confirma en el presente estudio, ya que en las tres poblaciones analizadas, en el estado de Chiapas, se encontraron evidencias de hibridación.

Se sabe que un factor que puede generar un aumento en el desequilibrio de ligamiento, es la mezcla de poblaciones, ya que una simple combinación de frecuencias genéticas diferentes, provocará un cambio en éstas, generando desviaciones al EHW (Freeman y Herron, 2002). Por lo tanto, es muy común encontrar evidencias de desequilibrio de ligamiento en zonas donde han ocurrido procesos de hibridación (Durand *et al.*, 2009; Gompert y Buerkle., 2009), lo cual se pudo corroborar en el Cañón del Sumidero y Villa Flores, donde diferentes pares de locus presentaron evidencias de desequilibrio. Por otro lado, en El Aguacate no se encontró desequilibrio de ligamiento, posiblemente, porque en esta población quizás los procesos de hibridación lleven ocurriendo más tiempo, provocando que al paso de las generaciones disminuya constantemente el desequilibrio (Freeman y Herron, 2002); por lo que podría decirse, que por ello, aún es posible detectarlo en los loci de Villa Flores, ya que en esta población los eventos de hibridación no sobrepasan las dos o tres generaciones (Pacheco-Sierra *com. pers.*). Asimismo, la presencia del desequilibrio de ligamiento en los pares de loci, puede ser un indicativo de que hay presiones de selección actuando en dichas zonas.

Otro punto a señalar, son los valores de  $H_o$  y  $H_e$  en *C. moreletii*, ya que fueron más altos en comparación a los de *C. acutus*, lo cual pudo haber sido por el efecto de los híbridos, debido a que en estas poblaciones (El Aguacate y Villa Flores) la mayoría de los individuos se identificaron como mezclados y se ha reportado que cuando hay una combinación de alelos y genotipos de dos especies diferentes, es muy común que la variabilidad genética aumente (Machkour-M'Rabet *et al.*, 2009). De esta manera, se puede decir que por ende, dichas poblaciones no mostraron alta diferenciación genética, ya que además de compartir proporciones genéticas de *C. moreletii*, también comparten algunas con *C. acutus*, acercándolas genéticamente aún más. Por otra parte, los individuos que se asignaron

pertenecientes a una tercera población, fue porque se trataba de los híbridos con mayores proporciones de mezcla genética.

De las tres poblaciones, Villa Flores era la única que se esperaba que tuviera individuos híbridos, ya que al ser una población no natural y debido al desconocimiento de las diferencias morfológicas, hace años en este sitio se introdujeron ambas especies en el cuerpo de agua artificial, facilitando de esta manera los apareamientos entre éstas (Domínguez-Laso *com. pers*). Por otra parte, El Aguacate, que se creía conformada totalmente de *C. moreletii*, casi todos sus individuos analizados fueron híbridos, lo cual puede deberse a la migración y flujo génico que puede tener ésta población con otras cercanas, como la de El Caracol, localidad donde se ha registrado también la presencia de híbridos (Pacheco-Sierra *et al.*, en revisión), por lo que se piensa que esto sería lo que estuviera favoreciendo la formación de híbridos en dicha población, no obstante para comprobar esta hipótesis es necesario medir el flujo génico entre éstas.

La población de *C. acutus* del Cañón del Sumidero, fue la que presento, de las dos especies, el mayor número de individuos no mezclados; sin embargo aquellos que mostraron proporciones genéticas más cercanas a *C. moreletii*, fueron individuos que por una equivocada identificación morfológica, en años pasados, se introdujeron a esta población, pero que después de localizarse nuevamente en el sitio, fueron removidos y colocados en cautiverio en el Museo del Cocodrilo del Zoológico ZOOMAT (Domínguez-Laso *com. pers*), pese a ellos no se descarta la posibilidad de que haya más individuos híbridos en esta población. Los datos obtenidos en el presente estudio indican que de las dos especies, *C. moreletii* es la que presento más individuos híbridos, lo cual concuerda con lo encontrado por Pacheco-Sierra *et al* (en revisión), quienes indican que muchas poblaciones de esta especie presentan evidencias de hibridación.

Aunque se detectaron individuos híbridos en ambas especies, la categorización de estos fue limitada, ya que muchos se asignaron como no mezclados para la especie que pertenecían; pese a ello hubo ciertas concordancias con los datos del índice de hibridación, ya que los individuos que mostraron las proporciones más altas hacia la especie contraria perteneciente, fueron detectados también como híbridos e incluso algunos se les categorizó como retrocruzas. Sin embargo, estos datos se deben de tomar con cautela, ya que se ha visto que los métodos de inferencia Bayesiana por su misma complejidad, pueden afectar la interpretabilidad y la exactitud de los datos de hibridación (Buerkle, 2005), sobrestimándolos (Payseur *et al.*, 2004) o bien subestimándolos como pudo haber ocurrido en el presente análisis.

El patrón de introgresión no se logró determinar, principalmente, por las pocas generaciones que llevan dándose los eventos de hibridación, ya que para observar un patrón

claro de introgresión es necesario que hayan transcurrido muchas generaciones de entrecruzamientos híbridos (>40; Pacheco-Sierra *com. pers.*). Lo cual no ha sucedido, al menos en Villa Flores, sitio donde se sabe que a lo mucho estos eventos llevan sucediendo tres generaciones, por lo que se infiere que en el Cañón del Sumidero y El Aguacate, la hibridación igualmente no lleve muchas generaciones, pero si un número mayor que Villa Flores, esto al ser poblaciones naturales. Otros factores que pudieron influir en los resultados obtenidos, fue el número de muestras, así como el número de loci de microsatélites utilizados, porque a pesar de que el método es algo sencillo, este puede mostrar un patrón más real al trabajar con valores de muestras y de loci mucho mayores a los utilizados en el presente estudio (Gompert y Buerkle, 2010).

Finalmente, el análisis para evaluar loci sujetos a selección, por efecto de la hibridación, (Gompert y Buerkle, 2009; Gompert y Buerkle, 2010) no mostró evidencias de ello, por lo que no se pudo definir si la selección es un proceso que esté sucediendo en estas poblaciones. Sin duda es necesario contar con un mayor número de loci de microsatélites para poder evaluar cuidadosamente este aspecto. Sin embargo, no hay que perder de vista que el hecho de que existan apareamientos entre las dos especies, genera muchos cambios en las frecuencias genéticas de los individuos en las poblaciones analizadas, los cuales podría provocar diferentes efectos, en futuras generaciones, en la evolución tanto de los híbridos como de las especies no mezcladas.

### **7.3 Aspectos de conservación**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que existe una diferenciación genética significativa entre *C. moreletii* y *C. acutus*. Asimismo, se reporta que en las tres poblaciones analizadas hay evidencias de hibridación, pero que a pesar de ello, cada especie conserva características genéticas propias, es decir, de las especies no mezcladas; así como buenos niveles de variación genética.

Con los datos de hibridación se pudo identificar que el Cañón del Sumidero, fue la población que presento un mayor número de individuos no mezclados, por lo que es de suma importancia mantenerla como primordial para proyectos de manejo y conservación, ya que no se descarta la posibilidad de que todavía se encuentren individuos híbridos en ella; asimismo, esto indica que dicha población no se ha visto tan afectada por la hibridación, como las de *C. moreletii* analizadas, donde la mayoría de los cocodrilos fueron híbridos. Lo cual llama mucho la atención, debido a que en El Aguacate no se esperaba encontrar altos niveles de mezcla

genética, por lo que es necesario continuar estudiándola para enfocar mejores planes de manejo, en lo que respecta a la identificación y remoción de híbridos. Por otro lado, Villa Flores resulta interesante, porque al ser una población no natural, se podría considerar como un laboratorio para observar como los apareamientos híbridos afectan a la evolución de estos individuos a través del tiempo.

Se ha documentado que en cocodrilos, la hibridación puede complicar la correcta identificación de especies, cuando sólo se basa en características morfológicas (Weaver *et al.*, 2008; Pacheco-Sierra *et al.* en revisión). Es por ello, la gran importancia de los estudios genéticos en poblaciones naturales, de éstas y otras especies, ya que al conjuntar información morfológica y genética, se tiene mayor certeza no solo para la identificación de especies, sino también para la asignación de individuos y la interpretación ancestral.

Por lo tanto, los resultados obtenidos resaltan la importancia de identificar qué poblaciones de estas especies son híbridas y cuáles no, no solamente de Chiapas, sino a lo largo de su distribución, para que los ejercicios y metas de conservación se enfoquen a ambas, pero siguiendo estrategias diferentes, ya que en las poblaciones con evidencias de hibridación lo más recomendable sería remover a los supuestos híbridos. Mientras que en las no mezcladas sería evitar la introducción de éstos, con la finalidad de mantener la variabilidad genética propia de cada especie. Asimismo, se deben estudiar las poblaciones híbridas con mayor énfasis, para determinar en qué dirección se están dando los procesos de introgresión, así como evaluar y establecer el efecto de las fuerzas evolutivas en los cambios de las frecuencias genotípicas en el curso de su evolución de estos reptiles. Dado que el proceso de hibridación puede generar una reducción de la diversidad de especies, provocando la pérdida de una especie involucrada cuando la introgresión ocurre con mayor frecuencia en contra de una de las especies o bien la pérdida de ambas como resultado de la formación de una nueva especie híbrida (Carling y Thomassen, 2012).

Por último, la información obtenida en el presente estudio no solo resulta valiosa para el conocimiento de la genética e hibridación de *C. moreletii* y *C. acutus* en el estado de Chiapas, sino que brinda información determinante para los programas de manejo y conservación. Aún más, al conjuntar esta información con la ecológica y ambiental, se podrán generar mejores propuestas y planes para la conservación de estos carismáticos e impresionantes reptiles.

## 8. Conclusiones

- La diversidad genética en las poblaciones estudiadas del estado de Chiapas fueron ligeramente mayores en *C. moreletii* respecto a lo observado en *C. acutus*. Asimismo, las poblaciones analizadas mostraron valores similares a otras que habitan en diferentes hábitats, incluso a pesar de estar aisladas.
- De las tres poblaciones, El Aguacate, fue la que presentó los mayores niveles de diversidad genética
- Existe una fuerte estructuración y diferenciación genética entre las poblaciones de *C. moreletii* (El Aguacate y Villa Flores) y *C. acutus* (Cañón del Sumidero), lo que ha permitido que conserven características genéticas únicas de cada una.
- Villa Flores y Cañón del Sumidero son poblaciones aisladas, por lo que el flujo génico con otras poblaciones es poco factible o nulo, mientras que El Aguacate puede tener intercambio de individuos con otras poblaciones cercanas de *C. moreletii*.
- Se encontró evidencias de hibridación en todas las poblaciones analizadas, pero en mayor proporción en El Aguacate y Villa Flores, las cuales correspondían a poblaciones de *C. moreletii*.
- No se logró categorizar de una marea clara a qué clase de híbridos correspondían los individuos con evidencias de mezcla genética.
- No fue posible encontrar un patrón de introgresión consistente en los loci utilizados, ni corroborar si alguno de éstos estaba bajo selección natural.
- La información genética obtenida de estas poblaciones será de gran utilidad para generar mejores propuestas de manejo y conservación, para éstas y otras poblaciones de cocodrilo del estado de Chiapas.

## 9. Referencias

- Aguilar-Miguel X. 2005a. *Crocodylus moreletii*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
- Aguilar-Miguel X. 2005b. *Crocodylus acutus*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
- Aguilar-Miguel, X. 2005c. *Caiman crocodilus*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
- Aguirre E. 2007. Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Compiladores: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre. pp. 49-61.
- Allendorf F. W. y G. H. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Population. Blackwell Publishing, UK.
- Álvarez del Toro, M. 1974. Los Crocodylia de México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México, D. F. 70 pp.
- Alvarez del Toro M. 1982. Los reptiles de Chiapas. 3<sup>ra</sup> edición. Instituto de Historia Natural del estado de Chiapas, México. 248 pp.
- Anderson E. C. y E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217-1229.
- Andrews C. A. 2010. Natural selection, genetic drift, and gene flow do not act in isolation in natural populations. *Nature Education Knowledge* 1(10):5.
- Amos W. y J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Proceedings of the Royal Society of London* 353:177-186.
- Arnold M. L. 1997. Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, Nueva York.
- Balloux F. y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.

- Barbadilla A. 2005. La genética de poblaciones. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Belkhir K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Arrufaste y F. Bonhomme. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bonin A., F. Nicole, F. Pompanon, C. Miaud y P. Taberlet. 2007. Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology* 21:697–708.
- Brochu C.A., J. K. Njau, R. J. Blumenschine y L. D. Densmore III. 2010. A New Horned Crocodile From Plio-Pleistocene Hominid Sites at Olduvai Gorge, Tanzania. *PLoS One* 5(2), e9333.
- Buerkle C. A. 2005. Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. *Molecular Ecology Notes* 5:648-687.
- Carling M. D. y H. A. Thomassen. 2012. The Role of Environmental Heterogeneity in Maintaining Reproductive Isolation between Hybridizing *Passerina* (Aves: Cardinalidae) Buntings. *International Journal of Ecology* 1-11.
- Carvajal R. I., M. Saavedra y J. J. Alava. 2005. Ecología poblacional, distribución y estudio de hábitat de *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807) en la Reserva de producción de fauna manglares El Salado del estuario del Golfo de Guayaquil, Ecuador. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40:141-150.
- Casas-Andreu G. y T. Reyna. 1994. Climate and distribution of *Crocodylus acutus* in the Mexican Pacific coast. *Biogeographica* 70(2):69-75.
- Casas-Andreu G. y G. Barrios-Quiroz. 2003. Hábitos alimenticios de *Crocodylus acutus* (Reptilia: Crocodylidae) determinados por el análisis de sus excretas en la costa de Jalisco, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 74(1):35-42.
- Casas-Andreu G., G. Barrios-Quiroz y R. Macip-Ríos. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(1):261-273.
- Casas-Andreu G., G. Barrios-Quiroz, A. H. Escobedo-Galván y X. Aguilar-Miguel. 2013. Sinopsis de datos biológicos del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 63 pp.

- Castillo A. 2007. La selección natural a nivel molecular. En: Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Copiladores: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre. pp. 11-48.
- Cavalli-Sforza L. L. y A. W. F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19(3):233-257.
- 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* 309A:661-673.
- Cedeño-Vázquez J. R., A. Villegas y L. Sigler. 2011. III) Manual de procedimientos. Guía gráfica para identificación morfológica de *Crocodylus moreletii* y posibles híbridos con *Crocodylus acutus*. En: Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Compiladores: Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajáuregui, A. García-Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez-Díaz. pp. 207-221.
- Challenger A., R. Dirzo, J. C. López, E. Mendoza y A. Lira-Noriega. 2009. Factores de cambio y estado de la biodiversidad, en *Capital natural de México*, vol. II: *Estado de conservación y tendencias de cambio*. Conabio, México. pp. 37-73.
- Chapuis M. P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3):621-631.
- Chenuil A. 2006. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127:101-120.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2011. III) Manual de procedimientos. Diseño geográfico del muestreo. En: Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Compiladores: Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajáuregui, A. García-Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez-Díaz. pp. 49-69.
- Cotroneo L. A. 2010. Population genetics and conservation of the American crocodile, *Crocodylus acutus*, on the Pacific coast of Costa Rica. Ph.D. Thesis. Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America.
- Dever J. A. y L. D. Densmore. 2001. Microsatellites in Morelet's (*Crocodylus moreletii*) and their utility in addressing crocodylian population genetics questions. *Journal of Herpetology* 35(3):541-544.

- Dever J. A., R. E. Strauss, T. R. Rainwater, S. T. McMurry y L. D. Densmore. 2002. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia*, 4:1078-1091.
- Dirzo R. y P. Raven. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annual Review of the Environment and Resources* 28:137-167.
- Domínguez-Laso J. 2006. Determinación del estado de las poblaciones silvestres del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México y evaluación de su estatus en la CITES. Instituto de Historia Natural y Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS009. México D. F.
- Domínguez-Laso J., O. Hinojosa-Falcón y S. Padilla-Paz. 2011. Método de marcaje y recaptura de ejemplares (MRE). En: Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Compiladores: Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajáuregui, A. García-Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez-Díaz. pp. 129-185.
- Durand E., F. Jay, O. E. Gaggiotti y O. François. 2009. Spatial Inference of Admixture Proportions and Secondary Contact Zones. *Molecular Biology and Evolution* 26(9):1963-1973.
- Earl D. A. y B. M. vonHold. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361.
- Eguiarte L. E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: La evolución biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Compiladores: Núñez-Farfán, J y L. E. Eguiarte. pp. 35-49.
- Ernst C. H., Ross, F. D. y Ross, C. A. 1999. *Crocodylus acutus* (Cuvier) American Crocodile. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles* 700:1-17.
- Evanno G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Excoffier L., P. E. Smmouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA haplotypes: aplicaciones to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier L. 2001. Analysis of population subdivision. In: Balding DJ, Bishop M, Cannings C (eds) Handbook of Statistical Genetics, John Wiley & Sons, Ltd: New York. pp 271-307.
- Excoffier L. y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

- 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.
- Ford D. y J. Golonka. 2003. Phanerozoic paleogeography, paleoenvironment, an lithofacies maps of the circum-Atlantic margins. *Marine Petroleum Geology* 20:249-285.
- Frankham R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2005. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, UK.
- Freeman S. y J. C. Herron. 2002. Análisis evolutivo. Prentice Hall. España. 703pp.
- Futuyma D. J. 2005. Evolution. 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachussetta. United States of America. 603pp.
- Gaggiotti O. E., O. Lange, K. Rassmann y C. Gliddons. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* 8:1513-1520.
- García, C. y M. Espinoza. 2006. Análisis genético en poblaciones de cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*) y cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) de los estados de Quintana Roo y Chiapas. En memorias del Congreso nacional de la Sociedad Mexicana de Genética. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.
- Gardner J. P. A. y K. J. Wei. 2015. The genetic architecture of hybridisation between two lineages of greenshell mussels. *Heredity* 114:344-355.
- Gardner J. P. A. 1997. Hybridization in the sea. *Advances in Marine Biology* 31:1-78.
- Gerlach G., A. Jueterbock, P. Kraemer, J. Deppermann y P. Harmand. 2010. Calculations of population differentiation based on  $G_{ST}$  y  $D$ : forget  $G_{ST}$  but nota  $I$  of statistics! *Molecular Ecology* 19:3845-3852.
- Gompert Z. y C. A. Buerkle. 2010. INTROGRESS: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources* 10:378-384.
- Gompert Z. y C. A. Buerkle. 2009. A powerful regression-based method for admixture mapping of isolation across the genome of hybrids. *Molecular Ecology* 18:1207-1224.
- González A. 2007. Ecología evolutiva de las zonas híbridas. En: Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Copiladores: Eguarte L. E., V. Souza y X. Aguirre. pp. 427-440.
- González-Trujillo R., D. Rodriguez, A. González-Romero, M. R. Forstner, L. D. Densmore III y V. H. Reynoso. 2012. Testing for hybridization and assessing genetic diversity in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) populations from central Veracruz. *Conservation Genetics* 13:1677-1683.

- Goudet J. 1995. FSTAT (v1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486. Última versión febrero 2002 (v.2:9.3.2).
- Goudet J., M. Raymond, T. de Meeüs y F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144:1933-1940.
- Guo S. W. y E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weingberg Proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Hamilton M. B. 2009. Population Genetics. Wiley-Blackwell. United States of America. 407pp.
- Hartl D. L. y A. G. Clark. 2006. Principles of population genetics. Sinauer Associates Inc. Sunderland. Massachussets. United States of America. 545pp.
- Hedrick P. W. 2011. Genetics of populations. 4<sup>th</sup> edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts. United States of America. 675pp.
- Hedrick P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59(8):1633-1638.
- Hedrick P. W. y S. T. Kalinowski. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:139-162.
- Hedrick P. W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313-318.
- Hekkala E. R. 2004. Conservation genetics at the species boundary: case studies from African and Caribbean crocodiles (Genus: *Crocodylus*). PhD Dissertation. Columbia University, New York, New York.
- Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). 2010. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Estado de Chiapas. Secretaría de Gobernación. <<http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM07chiapas/>> (Consultado: 5 julio 2013).
- Jahner J. P., A. M. Shapiro y M. L. Forister. 2011. Drivers of hybridization in a 66-generation record of *Colias* butterflies. *Evolution* 66(3):818-830.
- Jost L. 2008.  $G_{ST}$  and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17:4015-4026.
- Kalinowski S. T. y J. H. Powell. 2015. A parameter to quantify the degree of genetic mixing among individuals in hybrid populations. *Heredity* 114:249-254.
- La Esperanza Wildlife. 2012. <<http://laesperanzawildlife.com/finca-santuario-la-esperanza/>> (Consultado: 2 septiembre 2012).
- 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.

- Matschiner M. y W. Salzburger. 2009. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics* 25(15):1982-1983.
- McAliley L. R., R. E. Willis, D. A. Ray, P. Scott, 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.
- Meredith R. W., E. R. Hekkala, G. Amato y J. Gatesy. 2011. A phylogenetic hypothesis for *Crocodylus* (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: Evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60:183-191.
- Moreno A. 2007. Tamaño efectivo de la población. En: Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Copiladores: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre. pp. 63-86.
- Nei M. y A. K. Roychoudhury. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379-390.
- Ortiz M. T., L. Taras y A. M. Stavroulakis. 2000. The Hardy-Weinberg Equilibrium-Some helpful suggestions. *The American Biology Teacher* 62(1):20-22.
- Pacheco-Sierra G., Z. Gompert, J. Domínguez-Laso, E. Vázquez-Domínguez. 2015. Genetic and morphological evidence of a geographically widespread hybrid zone between two crocodile species, *Crocodylus acutus* and *C. moreletii*. *Molecular Ecology* (en revisión).
- Pacheco-Sierra G. 2010. Caracterización genética de *Crocodylus moreletii* en la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, Yucatán, México: Estructura genética poblacional y evidencia de hibridación entre *C. moreletii* y *C. acutus*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México. 70 pp.
- Payseur B. A., J. G. Krenz y M. W. Nachman. 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution* 3:2064-2078.
- Peakall R. y P. E. Smouse. 2012. GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Pérez-Higareda G., A. Rogel y H. M. Smith. 1989. The courtship and mating Behavior of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in southern Veracruz, Mexico. *Bulletin of the Chicago Herpetological Society* 7:131-132.
- Piñero D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha y R. Salas. 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 415-435.

- Piñero D., J. Caballero-Mellado, D. Cabrera-Toledo, C. E. Canteros, A. Casas, A. Castañeda, A. Castillo, R. Cerritos, O. Chassin-Noria, P. Colunga-GarcíaMarín, P. Delgado, P. Díaz-Jaimes, L. E. Eguiarte, A. E. Escalante, B. Espinoza, A. Fleury, S. Flores, G. Frago, J. González-Astorga, V. Islas, E. Martínez, F. Martínez, J. Martínez-Castillo, A. Mastretta, R. Medellín, L. Medrano-González, F. Molina-Freaner, B. Morales, A. Munguía, E. Payró de la Cruz, M. del R. Reyes-Montes, M. R. Robles, G. Rodríguez-Arellanes, L. Rojas, R. Romero-Martínez, J. H. Sahaza-Cardona, R. Salas, E. Sciutto, C. Scott, Y. Schramm, C. Silva, V. Souza, M. L. Taylor, J. Urbán, M. Uribe-Alcocer, M. de J. Vázquez, E. Vázquez-Domínguez, A. P. Vovides, A. Wegier, A. Zaldívar y G. Zúñiga. 2008b. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 437-494.
- Platt S. G. y J. B. Thorbjarnarson. 2000. Population status and conservation of Morelet's crocodile *Crocodylus moreletii*, in northern Belize. *Biological Conservation* 96(1):21- 29.
- Platt S. G. y T. R. Rainwater. 2005. A review of morphological character useful for distinguishing Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) and American crocodile (*Crocodylus acutus*) with emphasis on populations in the coastal zone of Belize. *Bulletin of the Chicago Herpetological Society* 40:25-29.
- Platt S.G., L. Sigler y T. R. Rainwater. 2010. Morelet's Crocodile *Crocodylus moreletii*. pp. 79-83 in Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Third Edition, ed. by S.C. Manolis and C. Stevenson. Crocodile Specialist Group: Darwin.
- Pritchard J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Pronatura-Chiapas. 2002. Programa de manejo del Parque Nacional Cañón del Sumidero, Chiapas. San Cristóbal de las Casas.
- Ray D. A., 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 III. 2004. Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conservation Genetics* 5:449-462.
- Raymond M. y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1283-1286.
- Rentaría M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Compiladores: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre. pp. 541-566.

- Rice W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Rodriguez D., J. R. Cedeño-Vázquez, M. R. Forster 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.
- Rodriguez D., M. R. J. Forstner, P. E. Moler, J. A. Wasilewski, M. S. Cherkiss y L. D. Densmore III. 2011. Effect of human-mediated migration and hybridization on the recovery of the American crocodile in Florida (USA). *Conservation Genetics* 12:449-459.
- Ross J.P. (ed.). 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2nd Edition. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. viii + 96 pp.
- Roos J. P., R. K. Aggarwal y A. Janke. 2007. Extended mitogenomic phylogenetic analyses yield new insight into crocodylian evolution and their survival of the Cretaceous-Tertiary boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45:663-673.
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F* Statistics under isolation by distance. *Genetics*. 145:1219-1228.
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Sánchez O. 2011. I) Introducción. En: Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Compiladores: Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajáuregui, A. García-Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez-Díaz. pp. 17-32.
- Sarukhán J., J. Carabias, P. Koleff y T. Urquiza-Haas. 2012. *Capital natural de México: Acciones estratégicas para su valoración, preservación y recuperación*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Selkoe K. A. y R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.
- Semagn K., A. Bjornstad y M. N. Ndjondjop. 2006. Aon overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25):2540-2568.
- Sigler L. 2010. La historia natural del Cocodrilo Americano *Crocodylus acutus* en el Parque Nacional Cañón del Sumidero, Chiapas, México. *Revista Latinoamericana de Conservación* 1: 73-82.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-562.

- Slatkin M. 1994. Gene flow and population structure. En: Ecological Genetics (ed Real LA). Princeton University Press. pp. 3-18.
- Slatkin M. 1989. El flujo génico en poblaciones naturales. En: La evolución biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Compiladores: Núñez-Farfán, J y L. E. Eguiarte. pp. 51-61.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.
- Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15(5):199-203.
- Thorbjarnarson J. 1989. Ecology of the American crocodile (*Crocodylus acutus*). In: Hall, P.M. (Ed.), Crocodiles: Their Ecology, Management, and Conservation. IUCN-The World Conservation Union Publications, Gland, Switzerland, pp. 228-258.
- Thorbjarnarson J. B. 2010. American Crocodile *Crocodylus acutus*. pp. 46-53. In: S. C. Manolis y Stevenson, C. (eds.). Crocodiles Status Survey and Conservation Action Plan. Third Edition, IUCN Crocodile Specialist Group: Darwin.
- Tucker A., H. McCallum, C. Limpus y K. McDonald. 1998. Sex-biased dispersal in a long-lived polygynous reptile (*Crocodylus johnstoni*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 44:85-90.
- Van Oosterhout C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHEKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.
- Vasoncelos W., T. Hrbek, R. Silveira, B. Thoisy, B. Marioni, y I. Farias. 2006. Population genetic of *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) from South America. *Genetics and Molecular Biology* 29(2):220-230.
- Wahlund S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelation-serscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus bethachtet. *Hereditas* 11:65-106.
- Weaver J. P., D. Rodríguez, M. Venegas-Anaya, J. R. Cedeño-Vázquez, M. R. J. Forstner y L. D. Densmore III. 2008. Genetic characterization of captive Cuban Crocodiles (*Crocodylus rhombifer*) and evidence of hybridization with the American Crocodile (*Crocodylus acutus*). *Journal of Experimental Zoology* 309A:649-660.
- Weir B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Whitlock M. C. 2011.  $G'_{ST}$  and  $D$  do not replace  $F_{ST}$ . *Molecular Ecology* 20:1083-1091.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395-420.

## 10. Anexos

**Anexo 1.** Inventario de muestras utilizadas en el presente estudio

#	ID	Especie	Tipo de muestra	Colectado en salida de campo	Localidad	Microsatélites
1	CQ1	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
2	CQ2	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
3	CQ3	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
4	CQ4	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
5	CQ5	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
6	CQ6	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
7	CQ200	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
8	CQ201	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
9	CQ202	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
10	CQ203	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
11	CQ204	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
12	CQ205	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
13	CQ206	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
14	CQ207	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
15	CQ209	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
16	CQ210	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
17	CQ212	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
18	CQ213	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
19	CQ216	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
20	CQ217	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	Si
21	CQ218	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
22	CQ208	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
23	CQ211	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
24	CQ214	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
25	CQ215	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
26	CQ219	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
27	CQ001 (A)	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
28	CQ001 (B)	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
29	CQ001 (C)	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	El Aguacate	N/A
30	G009	<i>Crocodylus moreletii</i>	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si
31	G191	-	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si
32	G226	-	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si
33	G260	-	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si

34	Copoya	<i>Crocodylus moreletii</i>	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si
35	Loquito	Híbrido	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si
36	CQ66	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
37	CQ501	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
38	CQ502	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
39	CQ503	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
40	CQ505	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
41	CQ506	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
42	CQ509	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
43	CQ521	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	No	Cañón del Sumidero	Si
44	CQ559	<i>Crocodylus acutus</i>	Sangre	No	Cañón del Sumidero	Si
45	CQ900	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
46	CQ901	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
47	CQ902	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
48	CQ903	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
49	CQ904	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
50	CQ905	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
51	CQ906	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
52	CQ907	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
53	CQ69	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
54	CQ68	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
55	CQ77	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
56	CQ91	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	N/A
57	CQ93	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
58	CQ97	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
59	CQ105	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
60	CQ149	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
61	CQ201	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del	Si

					Sumidero	
62	CQ226	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
63	CQ256	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
64	CQ320	<i>Crocodylus acutus</i>	Escama	Si	Cañón del Sumidero	Si
65	CQ3	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
66	CQ4	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
67	CQ6	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
68	CQ7	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
69	CQ8	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
70	CQ10	<i>Crocodylus moreletii</i>	Sangre	No	Villa Flores	Si
71	CQ11	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
72	CQ24	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
73	CQ29	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama y sangre	No	Villa Flores	Si
74	CQ32	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
75	CQ33	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
76	CQ35	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
77	CQ37	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
78	CQ38	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
79	CQ41	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
80	CQ290	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
81	CQ291	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
82	CQ292	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
83	CQ31	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama y sangre	Si	Villa Flores	Si
84	CQ36	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
85	CQ51	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
86	CQ53	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	N/A
87	CQ56	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
88	CQ57	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
89	CQ58	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
90	CQ59	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
91	CQ60	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
92	CQ61	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	Si	Villa Flores	Si
93	CQ50E	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
94	CQ51E	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si
95	CQ52E	<i>Crocodylus moreletii</i>	Escama	No	Villa Flores	Si

N/A = Número total de loci no amplificados, Si = Número total de loci amplificados.

## Anexo 2. Extracción de DNA

Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial Quick Gene DNA Tissue Kit S de la marca Fujifilms Life Science® a partir de muestras de tejido.

Añadir un fragmento de tejido de entre 5 y 10 mg, secarlo brevemente sobre papel absorbente y colocarlo en un tubo de 1.5 mL. Macerar o desgarra un poco el tejido.



Adicionar 180  $\mu$ L de solución de lisis (MDT) y 20  $\mu$ L de Proteinasa K (EDT), vortexear brevemente durante unos segundos e incubar a 55 °C hasta que se disuelva el tejido. Periódicamente vortexear durante el tiempo de degradación. Dependiendo del estado del tejido puede llevar desde 30 min, hasta una noche.



En seguida centrifugar a 10000 rpm por 3 min a temperatura ambiente (-25 °C) y rescatar el sobrenadante en un tubo nuevo.



Agregar 180  $\mu$ L de solución LTD (?), vortexear unos segundos e incubara a 70°C durante 10 min. Posteriormente adicionar 240  $\mu$ L de etanol >96% y poner unos segundos en spin.



Transferir el lisado a las columnas y realizar una primera presurización hasta que todo el líquido haya pasado por la membrana de la columna. Colocar el Mini 80 en posición de WASH.



Agregar 750  $\mu$ L de la solución de lavado (WDB) a la columna sin tocar la membrana. Realizar este lavado tres veces consecutivas.



Adicionar a la columna 120  $\mu$ L de solución de elución (CDT), agregarlo en dos repeticiones de 60  $\mu$ L, para recuperar el DNA de la membrana y presurizar hasta pasar todo el líquido por la columna.



Almacenar el DNA a -20 °C

Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial Quick-gDNA™MiniPrep de la marca Zymo Research a partir de muestras de sangre.

En un tubo de 1.5mL agregar 400µL de Genomic Lysis Buffer y un pequeño pedazo de sangre de 5 mm<sup>2</sup>aproximadamente.



Vortexear de 4 a 10 segundos y dejar reposar de 5 a 25 minutos a temperatura ambiente, dependiendo como vaya la lisis.



Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin™ en un tubo colector y centrifugar a 10000rpm por un minuto. Descartar el tubo colector con el fluido.



Transferir nuevamente la columna a un nuevo tubo colector. Agregar 200µL de Buffer Pre-Wash a la columna y centrifugar 10000rpm por un minuto.



Agregar 500µL de g-DNA Wash Buffer a la columna. Centrifugar a 10000rpm por un minuto.



Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga limpio. Agregar 120µL de DNA Elution Buffer a la columna.



Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y después centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos (contarlos después de que se haya alcanzado la máxima velocidad en la centrifuga).



Almacenar el DNA a -20°C

Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial ZR Genomic DNA™-Tissue MiniPrep de la marca Zymo Research a partir de muestras de tejido.

En un tubo de microcentrifuga agregar 95 µL de H<sub>2</sub>O, 95 µL 2X Digestion Buffer y 10 µL de Proteínasa K. Asimismo agregar un fragmento de tejido ≤ 25 mg.



Mezclar por vortexeo e incubar a 55°C por 1-3 horas. Dependiendo del estado de la muestra la digestión llevar un día completo.



Agregar 700 µL de Genomic Lysis Buffer al tubo y mezclar por vortexeo. En seguida centrifugar a 10000 rpm por un min para remover los desechos insolubles.



Transferir el sobrenadante a una columna Zymo-Spin™ en un tubo colector y centrifugar a 10000 rpm por un min.



Agregar 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna en un nuevo tubo colector y centrifugar a 10000 rpm por un min.



Agregar 400 µL de g-DNA Wash Buffer a la columna y centrifugar dos veces a 10000 rpm por un min.



Transferir la columna a un tubo de microcentrifuga limpio. Adicionar 60 µL de DNA Elution Buffer a la columna.



Dejar incubar el tubo por 2-5 min a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad por 30 seg (contarlos después de que se haya alcanzado la máxima velocidad en la centrifuga).



Almacenar el DNA a -20°C

**Anexo 3.** Microsatélites utilizados para *C. acutus* y *C. moreletii*

Primer	Secuencia 5'-3'	Fluorescencia	Ta (°C)	Intervalo reportado
Cj16	F: CATGCAGATTGTTATTCCTGATG R: TGTCATGGTGTCAATTAACCTC	6-FAM™	58	132-186
Cj127	F: CCCATAGTTTCCTGTTACCTG R: GTTTCCCTCTCTGACTTCAGTGTTG	HEX™	58	338-380
Cj119	F: GTTTGCTGTGGAATGTTTCTAC R: CGCTATATGAAACGGTGGCTG	HEX™	58	176-192
CUJ131	F: GTCCCTTCCAGCCCAAATG R: CGTCTGGCCAGAAAACCTGT	HEX™	58	Monomórfico
CUD68	F: GCTTCAGCAGGGGGCTACC R: CTGGGGAAACTGCACTTTAGG	6-FAM™	58	110-134
Cj35	F: GTTTAGAAGTCTCCAAGCCTCTCAG R: CTGGGGCAAGGATTTAACTCTC	6-FAM™	58	146-166
Cj131	F: GTTTGTCTTCTTCCTCCTGTCCCTC R: AAATGCTGACTCCTACGGATGG	6-FAM™	60	Monomórfico
Cj109	F: GTATTGTCAACCCACCGTGTC R: GTTTCCCCTCCACAGATTTACTTGC	6-FAM™	Td	362-374
Cj18	F: ATCCAAATCCCATGAACCTGAGAG R: CCGAGTGCTTACAAGAGGCTGG	HEX™	Td	190-204
Cj128	F: ATTGGGGCAGATAAGTGACTC R: GTTTCTTGCTTCTCTTCCCTACCTGG	HEX™	Td	221-257
C391	F ATGAGTCAGGTGGCAGGTTC R CATAAATACACTTTTGAGCAGCAG	6-FAM™	Td	144-178
Cj20	F: ACAATGGGGATCAGTGCAGAG R: GTTTCAAATCCACAGTCATATAGTCC	6-FAM™	58	151-201

**Anexo 4.** Concentración y volumen de los reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

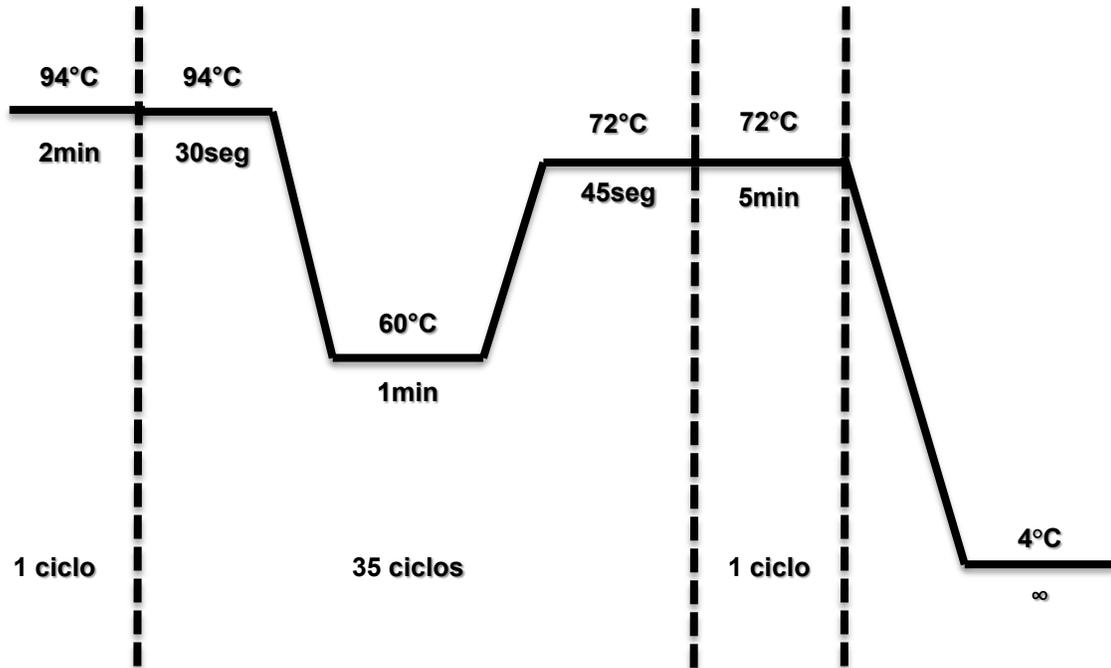
Reactivos	Concentraciones		Volumen (µL)		
	Iniciales	Finales	*[MgCl <sub>2</sub> ]= 1.5mM	+ [MgCl <sub>2</sub> ]= 2mM	-[MgCl <sub>2</sub> ]= 2mM [Taq pol]=0.1U/µL
Agua			3.445	3.375	4.15
Buffer	10X	1X	0.7	0.7	1
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5-2mM	0.21	0.28	0.4
DNTPs	2mM	0.25mM	0.875	0.875	1.25
Primer F	10µM	0.5µM	0.35	0.35	0.5
Primer R	10µM	0.5µM	0.35	0.35	0.5
Taq pol	5U/µL	0.05-0.1U/µL	0.07	0.07	0.2
ADN			1	1	2
Volumen final			7	7	10

Simple. \* Indica el volumen de cada reactivo para la amplificación del locus CJ131. + Indica el volumen de cada reactivo para la amplificación de los loci CJ16, CJ127, CJ119, CUJ131, CUD68, CJ35, CJ109, CJ18, CJ128, CJ391 y CJ20. – Indica el volumen de cada reactivo para la amplificación de los loci CJ16, CJ127, CJ119, CUD68, CJ109, CJ128, CJ391 y CJ20 en muestras difíciles.

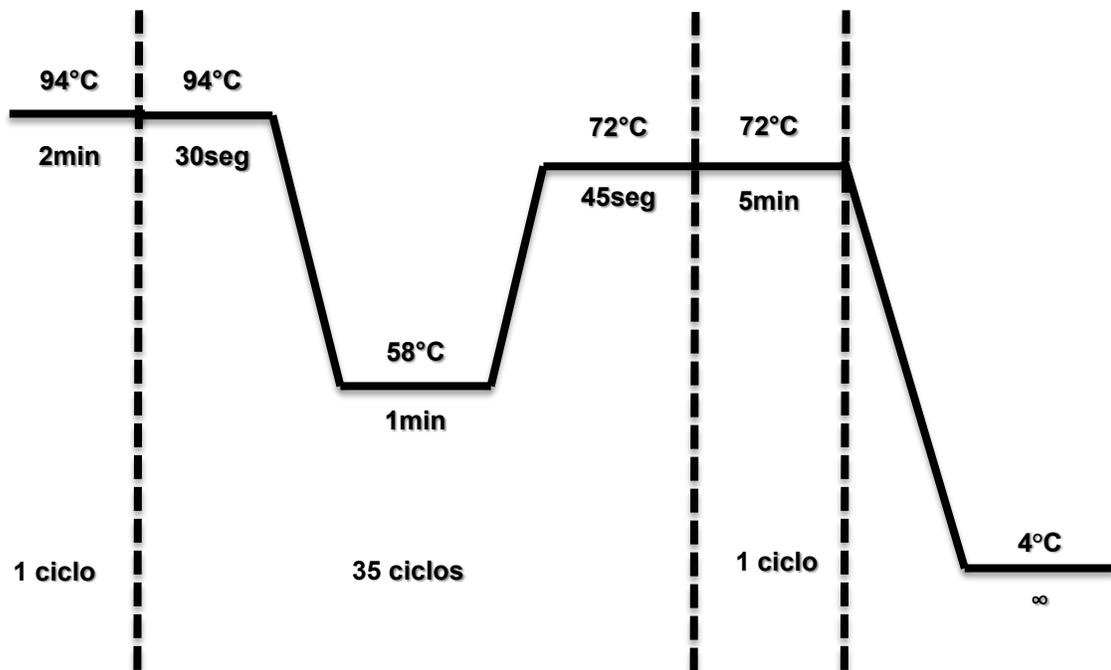
Reactivos	Concentraciones		*Volumen (µL)	+Volumen (µL)
	Iniciales	Finales		
Agua			3.25	4.25
Buffer	10X	1X	1.00	1
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM	0.40	0.4
DNTPs	2mM	0.2mM	1.25	1.25
Primer F	10µM	0.5µM	0.50	0.5
Primer R	10µM	0.5µM	0.50	0.5
Primer F	10µM	0.5µM	0.50	0.5
Primer R	10µM	0.5µM	0.50	0.5
Primer F	10µM	0.5µM	0.50	-
Primer R	10µM	0.5µM	0.50	-
Taq pol	5U/µL	0.05U/µL	0.1	0.1
ADN			1	1
Volumen final			10	10

Multiplex. \* Indica el volumen de cada reactivo para la amplificación en conjunto de los loci CJ16, CJ127 y CJ119, así como para los loci CUJ131, CUD68 y CJ35. + Indica el volumen de cada reactivo para la amplificación en conjuntos de los loci CJ109 y CJ18, además de los loci CJ128 y CJ391.

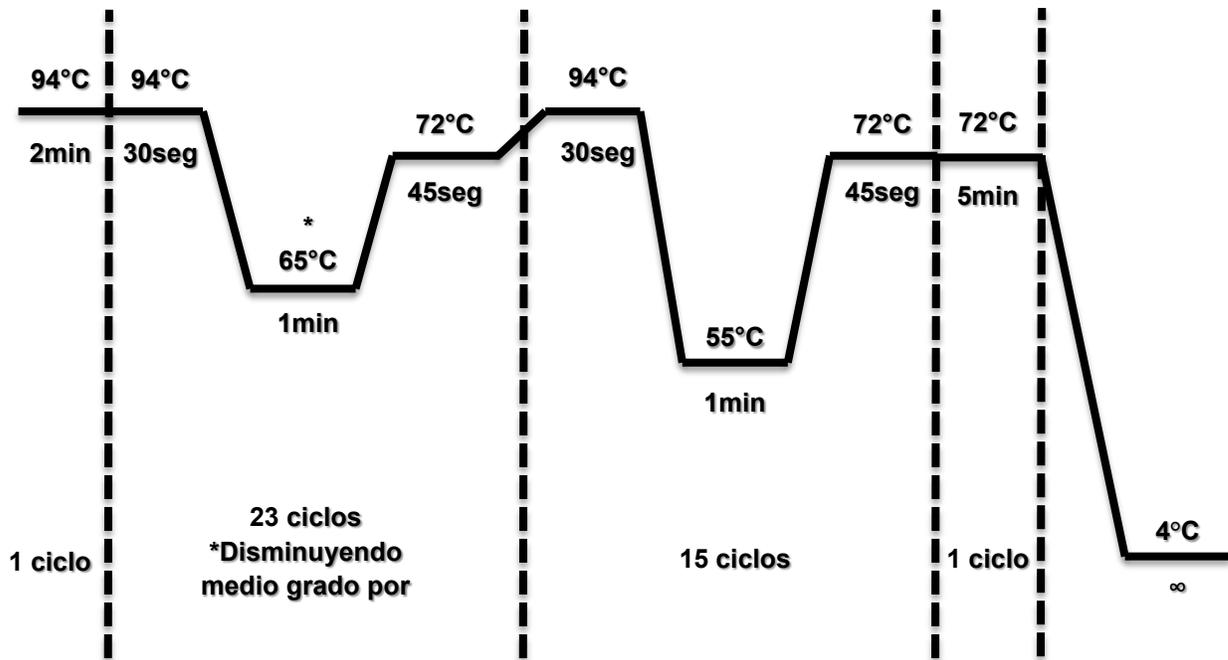
**Anexo 5.** Condiciones del termociclador para la amplificación de microsátélites por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



Simple. Temperaturas y números de ciclos de amplificación utilizados para el locus CJ131.



Simple. Temperaturas y números de ciclos de amplificación utilizados para los loci CJ16, CJ127, CJ119, CUJ131, CUD68, CJ35 Y CJ20.



Touchdown. Temperaturas y números de ciclos de amplificación utilizados para los loci Cj109, CJ18, CJ128 y CJ391.

**Anexo 6.** Valores de desequilibrio de ligamiento para todas las combinaciones de loci posibles

Pares de loci		El Aguacate		Cañón del Sumidero		Villa Flores	
		P	S. E.	P	S. E.	P	S. E.
CJ16	CJ119	0.460	0.000	0.010	0.000	0.001	0.000
CJ16	CJ127	0.003	0.000	0.0117	0.000	0.054	0.000
CJ119	CJ127	0.140	0.000	0.029	0.000	0.001	0.000
CJ16	CUD68	0.123	0.000	0.002	0.000	0.279	0.002
CJ119	CUD68	0.047	0.000	<b>0.001*</b>	0.000	0.014	0.000
CJ127	CUD68	0.291	0.001	0.024	0.000	0.014	0.000
CJ16	CJ35	0.644	0.000	<b>0.001*</b>	0.000	0.026	0.000
CJ119	CJ35	0.087	0.000	0.045	0.000	0.009	0.000
CJ127	CJ35	0.044	0.000	<b>0.000*</b>	0.000	<b>0.000*</b>	0.000
CUD68	CJ35	0.816	0.000	<b>0.000*</b>	0.000	0.003	0.000
CJ16	CJ109	0.683	0.000	<b>0.000*</b>	0.000	0.041	0.000
CJ119	CJ109	0.242	0.000	0.034	0.000	0.283	0.003
CJ127	CJ109	0.180	0.000	<b>0.000*</b>	0.000	0.017	0.000
CUD68	CJ109	0.102	0.000	0.045	0.000	0.152	0.001
CJ35	CJ109	0.351	0.000	0.004	0.000	0.007	0.000
CJ16	CJ18	0.888	0.000	0.091	0.001	0.100	0.000
CJ119	CJ18	0.982	0.000	0.031	0.000	0.075	0.000
CJ127	CJ18	0.269	0.001	0.001	0.000	<b>0.000*</b>	0.000
CUD68	CJ18	1	0	<b>0.001*</b>	0.000	0.001	0.000
CJ35	CJ18	0.584	0.000	<b>0.000*</b>	0.000	<b>0.000*</b>	0.000
CJ109	CJ18	0.112	0.000	0.102	0.000	0.007	0.000
CJ16	CJ128	0.215	0.000	0.014	0.000	0.051	0.001
CJ119	CJ128	0.015	0.000	0.497	0.003	0.026	0.001
CJ127	CJ128	0.019	0.000	0.003	0.000	0.008	0.000
CUD68	CJ128	0.099	0.000	0.148	0.002	0.161	0.002
CJ35	CJ128	0.972	0.000	0.004	0.000	0.010	0.000
CJ109	CJ128	0.156	0.000	<b>0.000*</b>	0.000	0.805	0.002
CJ18	CJ128	0.469	0.000	0.025	0.000	0.049	0.000
CJ16	CJ391	0.017	0.000	0.011	0.000	0.036	0.000
CJ119	CJ391	0.656	0.001	0.065	0.000	0.019	0.000
CJ127	CJ391	0.473	0.001	0.033	0.000	0.003	0.000
CUD68	CJ391	0.453	0.001	0.225	0.001	0.197	0.001
CJ35	CJ391	0.777	0.000	0.098	0.000	0.083	0.000
CJ109	CJ391	0.408	0.001	0.182	0.000	0.036	0.000
CJ18	CJ391	0.568	0.001	0.083	0.000	0.286	0.001
CJ128	CJ391	0.972	0.000	0.092	0.001	0.007	0.000
CJ16	CJ20	0.492	0.000	0.021	0.000	<b>0.000*</b>	0.000
CJ119	CJ20	0.120	0.000	0.001	0.000	0.017	0.000
CJ127	CJ20	0.222	0.001	<b>0.000*</b>	0.000	0.001	0.000
CUD68	CJ20	0.935	0.000	0.108	0.001	0.024	0.000
CJ35	CJ20	0.032	0.000	0.092	0.000	0.015	0.000
CJ109	CJ20	0.511	0.001	<b>0*</b>	0	0.286	0.001
CJ18	CJ20	0.663	0.001	0.138	0.0018	0.033	0.000
CJ128	CJ20	0.201	0.000	0.030	0.001	0.003	0.000
CJ391	CJ20	0.207	0.001	0.007	0.000	0.072	0.000

\* $P \leq 0.05$  con corrección secuencial de Bonferroni. P = Promedio y S. E. = Desviación estándar.

Anexo 7. Estadísticos  $F$  por locus obtenidos mediante el método de Weir y Cockerham

Locus	Comparaciones								
	El Aguacate y Cañón del Sumidero			Villa Flores y El Aguacate			Cañón del Sumidero y Villa Flores		
	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
CJ16	<b>0.361*</b>	<b>0.284*</b>	<b>0.107*</b>	<b>0.152*</b>	0.065	<b>0.092*</b>	<b>0.353*</b>	<b>0.194*</b>	<b>0.197*</b>
CJ119	0.600	<b>0.315*</b>	0.416	<b>0.155*</b>	<b>0.029*</b>	<b>0.130*</b>	<b>0.370*</b>	<b>0.257*</b>	<b>0.152*</b>
CJ127	0.613	<b>0.368*</b>	0.388	0.273	-0.007	0.278	0.633	<b>0.350*</b>	0.436
CUD68	-0.040	0.139	-0.207	<b>0.164*</b>	0.008	<b>0.157*</b>	0.113	<b>0.198*</b>	-0.105
CJ35	0.697	0.576	<b>0.285*</b>	0.369	0.011	0.362	0.901	0.668	0.702
CJ109	<b>0.396*</b>	<b>0.416*</b>	<b>-0.034*</b>	-0.068	<b>0.048*</b>	-0.122	<b>0.167*</b>	<b>0.253*</b>	-0.116
CJ18	0.675	0.476	0.380	<b>0.188*</b>	0.011	<b>0.179*</b>	0.645	0.533	<b>0.241*</b>
CJ128	0.063	0.217	-0.196	-0.210	<b>0.012*</b>	-0.225	0.032	0.143	-0.130
CJ391	<b>0.357*</b>	<b>0.272*</b>	<b>0.116*</b>	<b>0.052*</b>	0.076	<b>-0.026*</b>	0.015	<b>0.177*</b>	-0.197
CJ20	0.142	0.181	<b>-0.047*</b>	-0.065	<b>0.039*</b>	-0.109	<b>0.309*</b>	0.104	<b>0.228*</b>
Todos los loci	<b>0.382*</b>	<b>0.326*</b>	<b>0.083*</b>	<b>0.069*</b>	<b>0.033*</b>	<b>0.037*</b>	<b>0.375*</b>	<b>0.293*</b>	<b>0.116*</b>
IC (99%)	0.172- 0.582	0.224- 0.438	-0.090- 0.289	-0.055- 0.199	0.012- 0.054	-0.090- 0.180	0.152- 0.610	0.169- 0.451	-0.064- 0.317

\* indica los valores que se encontraron dentro de los intervalos de confianza. IC = Intervalo de confianza.

**Anexo 8.** Estadísticos de diferenciación genética de  $G'_{ST}$  y  $D_{Est}$  para cada locus

Locus	Comparaciones											
	El Aguacate y Cañón del Sumidero				Villa Flores y El Aguacate				Cañón del Sumidero y Villa Flores			
	$G'_{ST}$	$P$	$D_{Est}$	$P$	$G'_{ST}$	$P$	$D_{Est}$	$P$	$G'_{ST}$	$P$	$D_{Est}$	$P$
CJ16	0.177	<b>0.003*</b>	0.641	<b>0.003*</b>	0.036	<b>0.024*</b>	0.092	0.057	0.109	<b>0.003*</b>	0.615	<b>0.003*</b>
CJ119	0.165	<b>0.003*</b>	0.274	<b>0.003*</b>	0.016	0.230	0.070	0.233	0.143	<b>0.003*</b>	0.262	<b>0.003*</b>
CJ127	0.238	<b>0.003*</b>	0.837	<b>0.003*</b>	-0.000	1.000	-0.000	1.000	0.216	<b>0.003*</b>	0.831	<b>0.003*</b>
CUD68	0.072	<b>0.003*</b>	0.304	<b>0.003*</b>	0.005	0.536	0.020	0.617	0.108	<b>0.003*</b>	0.454	<b>0.003*</b>
CJ35	0.404	<b>0.003*</b>	0.693	<b>0.003*</b>	0.008	0.539	0.006	0.509	0.510	<b>0.003*</b>	0.713	<b>0.003*</b>
CJ109	0.239	<b>0.003*</b>	0.544	<b>0.003*</b>	0.023	0.117	0.093	0.087	0.140	<b>0.003*</b>	0.279	<b>0.003*</b>
CJ18	0.326	<b>0.003*</b>	0.712	<b>0.003*</b>	0.006	0.602	0.005	0.590	0.370	<b>0.003*</b>	0.662	<b>0.003*</b>
CJ128	0.126	<b>0.003*</b>	0.688	<b>0.003*</b>	0.004	0.371	0.013	0.404	0.076	<b>0.003*</b>	0.605	<b>0.003*</b>
CJ391	0.135	<b>0.003*</b>	0.310	<b>0.003*</b>	0.036	<b>0.036*</b>	0.144	<b>0.015*</b>	0.093	<b>0.003*</b>	0.110	<b>0.003*</b>
CJ20	0.099	<b>0.003*</b>	0.381	<b>0.003*</b>	0.019	0.075	0.082	0.069	0.05656	<b>0.003*</b>	0.265	<b>0.003*</b>

\* $P \leq 0.05$  con corrección secuencial de Bonferroni.

**Anexo 9.** Coeficiente  $F_{ST}$  por locus con y sin corrección ENA para alelos nulos

Locus	Comparaciones					
	El Aguacate y Cañón del Sumidero		Villa Flores y El Aguacate		Cañón del Sumidero y Villa Flores	
	$F_{ST}$ (s/c)	$F_{ST}$ (c)	$F_{ST}$ (s/c)	$F_{ST}$ (c)	$F_{ST}$ (s/c)	$F_{ST}$ (c)
CJ16	<b>0.284*</b>	<b>0.285*</b>	0.065	0.079	<b>0.193*</b>	<b>0.177*</b>
CJ119	<b>0.315*</b>	<b>0.245*</b>	<b>0.028*</b>	<b>0.025*</b>	<b>0.256*</b>	<b>0.192*</b>
CJ127	<b>0.368*</b>	<b>0.366*</b>	-0.006	0.004	<b>0.349*</b>	<b>0.304*</b>
CUD68	0.138	0.136	0.008	0.008	<b>0.197*</b>	<b>0.190*</b>
CJ35	0.575	0.540	0.011	0.005	0.668	0.567
CJ109	0.415	0.415	<b>0.048*</b>	<b>0.048*</b>	<b>0.252*</b>	<b>0.254*</b>
CJ18	0.475	0.425	0.010	<b>0.035*</b>	0.532	0.521
CJ128	0.216	0.216	0.012	0.013	0.143	0.141
CJ391	<b>0.272*</b>	<b>0.298*</b>	0.075	0.082	0.177	<b>0.177*</b>
CJ20	0.180	0.171	<b>0.039*</b>	<b>0.034*</b>	0.104	0.090
Todos los loci	<b>0.325*</b>	<b>0.311*</b>	<b>0.032*</b>	<b>0.035*</b>	<b>0.292*</b>	<b>0.264*</b>
IC (95%)	0.246- 0.408	0.237- 0.386	0.016- 0.048	0.019- 0.054	0.188- 0.406	0.172- 0.366

\* indica los valores que se encontraron dentro de los intervalos de confianza. IC = Intervalo de confianza, s/c = sin corrección y c = con corrección.

**Anexo 10.** Distancias genéticas pareadas de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) (D) por locus con y sin corrección INA para alelos nulos

Locus	Comparaciones					
	El Aguacate y Cañón del Sumidero		Villa Flores y El Aguacate		Cañón del Sumidero y Villa Flores	
	D (s/c)	D (c)	D (s/c)	D (c)	D (s/c)	D (c)
CJ16	0.616	0.624	0.363	0.399	0.564	0.542
CJ119	0.364	0.361	<b>0.300*</b>	<b>0.294*</b>	0.363	0.376
CJ127	0.721	0.747	<b>0.319*</b>	0.365	0.703	0.654
CUD68	0.365	0.374	<b>0.280*</b>	0.280	0.370	0.382
CJ35	<b>0.498*</b>	<b>0.557*</b>	0.204	<b>0.354*</b>	<b>0.534*</b>	<b>0.529*</b>
CJ109	<b>0.453*</b>	0.453	0.235	0.241	0.344	0.347
CJ18	0.677	0.651	0.219	0.286	0.561	0.592
CJ128	0.638	0.638	<b>0.274*</b>	0.283	<b>0.543*</b>	0.542
CJ391	0.447	<b>0.475*</b>	0.398	0.415	0.321	0.321
CJ20	0.451	<b>0.470*</b>	<b>0.267*</b>	<b>0.311*</b>	<b>0.495*</b>	<b>0.459*</b>
Todos los loci	<b>0.523*</b>	<b>0.535*</b>	<b>0.286*</b>	<b>0.323*</b>	<b>0.480*</b>	<b>0.474*</b>
IC (95%)	0.452- 0.597	0.462- 0.609	0.252- 0.327	0.291- 0.358	0.409- 0.551	0.409-0.539

\* indica los valores que se encontraron dentro de los intervalos de confianza. IC = Intervalo de confianza, s/c = sin corrección y c = con corrección.

**Anexo 11.** Diferenciación alélica y genotípica entre poblaciones por locus

Locus	Comparaciones											
	El Aguacate y Cañón del Sumidero				Villa Flores y El Aguacate				Cañón del Sumidero y Villa Flores			
	Diferenciación alélicas		Diferenciación genotípica		Diferenciación alélicas		Diferenciación genotípica		Diferenciación alélicas		Diferenciación genotípica	
	<i>P</i>	S.E.	<i>P</i>	S.E.	<i>P</i>	S.E.	<i>P</i>	S.E.	<i>P</i>	S.E.	<i>P</i>	S.E.
CJ16	<b>0.00000*</b>	0.000	0.00003	0.000	<b>0.00050*</b>	0.000	<b>0.00238*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ119	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.01137	0.000	0.04335	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ127	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.02910	0.000	0.07453	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CUD68	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.02236	0.000	0.03239	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ35	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.04534	0.000	0.08725	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ109	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.02008	0.000	0.01911	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ18	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.04825	0.000	0.05683	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ128	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.18297	0.000	0.26150	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ391	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00005*</b>	0.000	<b>0.00081*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
CJ20	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	0.03437	0.000	0.09423	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000	<b>0.00000*</b>	0.000
Todos los loci	<b>Highly sign.</b>		<b>Highly sign.</b>		<b>0.00000*</b>		<b>0.00000*</b>		<b>Highly sign.</b>		<b>Highly sign.</b>	

\* $P \leq 0.05$  con corrección secuencial de Bonferroni. *P* = Promedio y S. E. = Desviación estándar.

**Anexo 12.** Valores del índice de hibridación e intervalos de confianza (95%) para las tres poblaciones

<b>Población</b>	<b>ID</b>	<b>H</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>El Aguacate</b>	CQ1	0.3444576	0.1033989	0.6481996
	CQ3	0.1728817	0.0301285	0.4431643
	CQ5	0.3333333	0.095785	0.6442321
	CQ6	0.309017	0.0583113	0.6781683
	CQ202	0	0	0.2836901
	CQ205	0.2264512	0.0153107	0.623846
	CQ201	0.3420351	0.1264214	0.6095575
	CQ206	0.2518398	0.0471241	0.5792981
	CQ204	0.2397713	0.0438333	0.564516
	CQ207	0.3467152	0.1285528	0.6154063
	CQ200	0.3273313	0.0742427	0.659441
	CQ4	0.2978033	0.0593655	0.639228
	CQ218	0	0	0.3298238
	CQ212	0.2017078	0.0354435	0.5040659
	CQ216	0.1471057	0.0248691	0.3955647
	CQ203	0.1875	0.0485753	0.4224319
	CQ2	0	0	0.1921381
	CQ209	0.4093223	0.1825869	0.6605117
	CQ217	0.1683814	0.0290293	0.4371605
	CQ213	0.4136203	0.1706151	0.6903094
<b>Villa Flores</b>	CQ33	0	0	0.1849329
	CQ35	0.1994322	0.0144007	0.5617581
	CQ38	0.4462249	0.1374084	0.7833433
	CQ41	0	0	0.3519972
	CQ24	0.3088163	0.0919359	0.5996225
	CQ32	0.3968858	0.1420936	0.6986367
	CQ37	0.2104899	0.0370718	0.5233427
	CQ31	0.2997408	0.0826705	0.6078069
	CQ29	0.1937129	0.0339611	0.486517
	CQ36	0.1299077	0.0075599	0.4431236
	CQ10	0	0	0.2364119
	CQ57	0.4342585	0.1624411	0.7309134
	CQ59	0.3285282	0.0821775	0.6401118
	CQ58	0.1683814	0.0290293	0.4371605
	CQ51	0.2507302	0.0674137	0.5309791
	CQ56	0.2996652	0.1027513	0.5673454
	CQ60	0.210436	0.0150425	0.5957139
	CQ61	0.3899376	0.1067923	0.7094566
	50 Esp	0.106316	0.0059209	0.3938791

	51 Esp	0	0	0.2364119
	52 Esp	0.4112633	0.1768201	0.6742348
	CQ 290	0.7056506	0.4075136	0.9177249
	CQ 291	0.83863	0.5779235	0.9723034
	CQ 292	0.8772351	0.5594567	0.9930929
	3	0.3486732	0.1408338	0.6040692
	4	0.5353254	0.2645046	0.7880686
	6	0.246928	0.0669425	0.5199314
	7	0.4153646	0.1899509	0.6664382
	8	0.3846713	0.1387341	0.6770683
	11	0.113008	0.0065129	0.3964908
<b>Cañón del Sumidero</b>	G009	0.2898979	0.0553705	0.6390504
	G226	0.2929474	0.0815872	0.5912926
	Copoya	0.2521198	0.0463432	0.588682
	G260	0.3999255	0.1669263	0.6665572
	G191	0.6845378	0.3581801	0.9139121
	Loquito	0.6258082	0.3344671	0.8642589
	CQ559	0.9260535	0.7171795	0.9959002
	CQ900	0.9467591	0.7807925	0.9970997
	CQ149	1	0.8458034	1
	CQ201	1	0.8657577	1
	CQ97	1	0.8458034	1
	CQ105	1	0.8458034	1
	CQ68	0.9070152	0.640606	0.9949076
	CQ226	1	0.8624536	1
	CQ320	1	0.8657577	1
	CQ256	1	0.8458034	1
	CQ69	0.9275715	0.7120829	0.9960677
	CQ505	1	0.8657577	1
	CQ502	1	0.8621085	1
	CQ521	1	0.8817807	1
	CQ501	1	0.8947086	1
	CQ906	0.9355239	0.7432019	0.9964924
	CQ907	1	0.8504725	1
CQ66	0.8660254	0.6338608	0.9775057	

**Anexo 13.** Frecuencias genotípicas de las diferentes categorías híbridas

	ID	P0	P1	F1	F2	R0	R1
<b>San Luis Potosí</b>	SL01	0	0.99992	0	0.00002	0	0.00007
	SL02	0	0.99996	0	0.00001	0	0.00003
	SL03	0	0.99993	0	0.00002	0	0.00005
	SL04	0	0.99995	0	0.00001	0	0.00004
	SL05	0	0.99996	0	0.00001	0	0.00003
	SL06	0	0.99993	0	0.00002	0	0.00005
	SL07	0	0.99995	0	0.00001	0	0.00003
	SL08	0	0.99993	0	0.00002	0	0.00005
	SL09	0	0.99995	0	0.00002	0	0.00003
	SL10	0	0.99993	0	0.00003	0	0.00004
	SL11	0	0.99981	0	0.00005	0	0.00013
<b>El Aguacate</b>	CQ1	0	0.99959	0	0.00008	0	0.00034
	CQ3	0	0.99992	0	0.00003	0	0.00005
	CQ5	0	0.99984	0	0.00003	0	0.00013
	CQ6	0	0.99746	0	0.00027	0	0.00227
	CQ202	0	0.99975	0	0.00004	0	0.0002
	CQ205	0	0.99435	0	0.00096	0	0.00469
	CQ201	0	0.99964	0	0.00007	0	0.00029
	CQ206	0	0.99207	0.00037	0.00103	0	0.00652
	CQ204	0	0.99963	0	0.00006	0	0.00031
	CQ207	0	0.99441	0	0.00114	0	0.00446
	CQ200	0	0.99879	0	0.00024	0	0.00098
	CQ4	0	0.99954	0	0.0001	0	0.00036
	CQ218	0	0.99989	0	0.00004	0	0.00007
	CQ212	0	0.99977	0	0.00004	0	0.00019
	CQ216	0	0.9999	0	0.00002	0	0.00008
	CQ203	0	0.98214	0	0.00805	0	0.0098
	CQ2	0	0.99993	0	0.00003	0	0.00005
	CQ209	0	0.99859	0	0.00042	0	0.00099
	CQ217	0	0.99956	0	0.00004	0	0.00039
	CQ213	0	0.99735	0.00001	0.00053	0	0.0021
	CQ33	0	0.99991	0	0.00003	0	0.00006
	CQ35	0	0.99976	0	0.00007	0	0.00018
	CQ38	0	0.99969	0	0.00006	0	0.00026
	CQ41	0	0.99982	0	0.00004	0	0.00013
	CQ24	0	0.9996	0	0.00007	0	0.00033
	CQ32	0	0.99684	0	0.00059	0	0.00257
	CQ37	0	0.99977	0	0.00006	0	0.00018
	CQ31	0	0.99978	0	0.00004	0	0.00018

<b>Villa Flores</b>	CQ29	0	0.99992	0	0.00003	0	0.00005
	CQ36	0	0.9998	0	0.00003	0	0.00016
	CQ10	0	0.99984	0	0.00004	0	0.00011
	CQ57	0	0.99989	0	0.00003	0	0.00008
	CQ59	0	0.99927	0	0.00019	0	0.00054
	CQ58	0	0.99984	0	0.00003	0	0.00013
	CQ51	0	0.99977	0	0.00004	0	0.00019
	CQ56	0	0.99981	0	0.00004	0	0.00016
	CQ60	0	0.99916	0	0.0002	0	0.00065
	CQ61	0	0.99957	0	0.0001	0	0.00033
	CQ50E	0	0.99981	0	0.00004	0	0.00015
	CQ51E	0	0.9999	0	0.00005	0	0.00005
	CQ52E	0	0.99915	0	0.00022	0	0.00063
	CQ290	0.00484	0	0.00005	0.49151	0.50357	0.00003
	C Q291	0.66643	0	0	0.01775	0.31583	0
	CQ292	0.7483	0	0.00013	0.01968	0.23188	0
	CQ3	0	0.99916	0	0.0001	0	0.00074
	CQ4	0	0.99538	0	0.00142	0	0.0032
	CQ6	0	0.9995	0	0.00005	0	0.00045
	CQ7	0	0.99875	0	0.0002	0	0.00105
CQ8	0	0.99982	0	0.00002	0	0.00016	
CQ11	0	0.99978	0	0.00004	0	0.00017	
<b>Cañón del Sumidero</b>	G009	0	0.99983	0	0.00004	0	0.00013
	G226	0	0.9998	0	0.00004	0	0.00015
	Copoya	0	0.99944	0	0.00014	0	0.00042
	G260	0	0.99949	0	0.00008	0	0.00042
	G191	0	0.98727	0	0.00644	0	0.00628
	Loquito	0.00044	0.00123	0.22167	0.27467	0.47486	0.02714
	CQ559	0.98326	0	0	0.00035	0.01638	0
	CQ900	0.99768	0	0	0.00004	0.00228	0
	CQ903	0.99961	0	0	0.00003	0.00036	0.00001
	CQ904	0.99945	0	0	0.00002	0.00052	0.00001
	CQ149	0.99874	0	0	0.00004	0.00121	0.00001
	CQ201	0.9993	0	0	0.00003	0.00067	0
	CQ97	0.99933	0	0	0.00003	0.00064	0
	CQ105	0.99929	0	0	0.00003	0.00067	0
	CQ77	0.99837	0	0	0.00004	0.0016	0
	CQ68	0.9566	0	0	0.00069	0.04271	0
	CQ226	0.99617	0	0	0.00008	0.00375	0
CQ320	0.99927	0	0	0.00003	0.00069	0	
CQ256	0.9992	0	0	0.00003	0.00076	0	

	CQ905	0.9996	0	0	0.00002	0.00037	0.00001
	CQ93	0.99948	0	0	0.00003	0.00048	0
	CQ69	0.99053	0	0	0.0001	0.00937	0
	CQ901	0.99876	0	0	0.00004	0.0012	0
	CQ902	0.99906	0	0	0.00004	0.00091	0
	CQ506	0.99948	0	0	0.00003	0.00049	0
	CQ506	0.99926	0	0	0.00003	0.0007	0
	CQ502	0.999	0	0	0.00003	0.00096	0
	CQ521	0.99924	0	0	0.00003	0.00073	0
	CQ501	0.99921	0	0	0.00003	0.00076	0
	CQ906	0.99142	0	0	0.00013	0.00844	0.00001
	CQ907	0.99418	0	0	0.00007	0.00575	0
	CQ66	0.74498	0	0	0.01102	0.244	0
	CQ509	0.99793	0	0	0.00005	0.00201	0
	CQ503	0.99945	0	0	0.00003	0.00052	0

P0 = *C. acutus*, P1 = *C. moreletii*, F1 = Híbridos F<sub>1</sub>, F2 = Híbridos F<sub>2</sub>, R1 = Retrocruza con *C. acutus* y R2 = Retrocruza con *C. moreletii*.