

T
1009

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

79633

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA POBLACIÓN DE
COCODRILO DE RÍO (*Crocodylus acutus*) EN EL
PACÍFICO MEXICANO

T E S I S

(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M.V.Z. Wendy Quetzal Morel Schramm

COMITÉ TUTORAL

Directora:

Ph D. María de Lourdes Alonso Spilsbury

Asesor:

Dr. Daniel Martínez Gómez

Asesor:

Dr. Clemente Lemus Flores

MÉXICO, D. F. FEBRERO 2010

CONTENIDO

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Introducción.....	1
I. Antecedentes	3
1. Origen y clasificación de los cocodrilos.....	3
2. Cocodrilo del río.....	3
2.1 Características.....	4
2.2 Hábitat.....	6
2.3 Situación actual en México.....	7
2.4 Importancia de la especie.....	8
3. Diversidad de poblaciones.....	10
4. Estudios genéticos en poblaciones.....	13
4.1 Marcadores genéticos.....	14
5. Estudios genéticos en cocodrilos.....	18
6. Evaluación de la variabilidad genética.....	20
7. Parámetros y variables para medir la diversidad genética.....	22
II. Planteamiento del problema.....	26
III. Objetivos.....	28
IV. Hipótesis.....	28
V. Material y Métodos	
1. Área de estudio.....	29

2.	Captura de animales.....	30
3.	Muestreo sanguíneo.....	32
4.	Registros biométrico-morfológicos.....	33
5.	Extracción de ADN y amplificación por PCR.....	34
6.	Análisis estadísticos.....	37
VI.	Resultados.....	38
VII.	Discusión.....	61
VIII.	Conclusiones.....	64
IX.	Literatura citada.....	65
X.	Anexos.....	i

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar*

Antonio Machado

A mi madre, una luchadora incansable.

A mi padre, un espíritu inquebrantable.

A mi hermana, Paco y Gala, un trío que inicia su camino.

A mis profesores, por su guía en esta etapa.

A mis compañeros por su apoyo incondicional.

A las instituciones que permitieron la realización de esta investigación

*A esta casa que una vez más me permitió llevar a cabo mis sueños
"Casa abierta al tiempo"*

Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco

RESUMEN

El cocodrilo de río es una especie que actualmente se encuentra en peligro de extinción debido a la fragmentación de su hábitat así como la caza furtiva. Esto aunado a la falta de información sobre la especie ha generado la realización de estudios sobre su genética poblacional. En este trabajo se determinó el nivel de variabilidad genética de una población de cocodrilo de río (*C. acutus*) en el estado de Jalisco (Puerto Vallarta), empleando técnicas moleculares basadas en marcadores genéticos; dado a que no existía en la literatura secuencias de microsatélites para *C. acutus*, en este estudio se emplearon microsatélites desarrollados para cocodrilo australiano de agua dulce (*C. johnsoni*). Los seis microsatélites seleccionados fueron utilizados con ADN de 9 cocodrilos *C. acutus*, provenientes del Centro Universitario de la Costa, CIPACTLI, mismo que se dedica a la captura y rescate de cocodrilos. Los productos amplificados por PCR se corrieron en un secuenciador para conocer su tamaño exacto, posteriormente se calcularon: el índice de polimorfismo de los iniciadores, el número de alelos efectivos, la heterocigosidad, la diversidad genética, el equilibrio de Hardy-Weinberg, y la distancia génica. El uso de marcadores moleculares diseñados para *C. porosus* para determinar la diversidad genética en *C. acutus* resultó una técnica efectiva en el presente estudio. El mejor marcador para determinar la variabilidad genética en *C. acutus* fue el *Cj109*, con un índice de $D = 0.776$, superando a los demás iniciadores empleados. La población presentó una alta heterocigosidad genética, determinando que los individuos pudieran pertenecer a distintas poblaciones, ayudando a mantener el "pool" genético en la especie. Así mismo, la población mostró una alta diversidad genética ($F = -0.179$). Se pudo identificar 4 clados: uno para la zona de Bahía de Banderas (Jal.), y 3 más para zonas de Nayarit y Jalisco. Sin embargo, es recomendable realizar otros estudios con microsatélites, incrementando el tamaño de muestra y tomando en consideración las variables morfométricas de los individuos.

Palabras clave: *C. acutus*, microsatélites, DNA, heterocigosidad, cocodrilo.

ABSTRACT

The river crocodile is a specie in danger of extinction due to the fragmentation of its habitat as well as the furtive hunting. The lack of information on this species has brought interest on population genetics studies. The aim of this study was to determine the level of genetic variability on a population of American crocodile (*C. acutus*) in the state of Jalisco (Vallarta Port), proving the operation and application of genetic markers through microsatellites developed for Australian fresh water crocodile (*C. johnsoni*). The DNA of 9 crocodiles, *C. acutus* from the University Center of the Coast, CIPACTLI was used. The fragments by PCR were amplified and the following traits were calculated: the weights of the obtained bands, the index of polymorphism of the initiators, the number of effective alleles, the heterozygosis, the genetic diversity, the Hardy-Weinberg equilibrium and the genic distance. The use of molecular markers designed for *C. porosus* to determine the genetic diversity in *C. acutus* was an effective technique in the present study. The best primer to determine the genetic variability in *C. acutus* was Cj109, with an index of $D = 0.776$, surpassing to the other used primers. The population displayed a high heterozygosity, determining that the individuals could belong to different populations, which might help to maintain a genetic pool in this specie. Also, the studied population showed a high genetic diversity ($F = -0.179$) that is favorable for the Center, and will allow to create a breeding stock in the zone. It was possible to identify 4 clades: one for the zone of Bay of Flags (Jal.), and 3 more for zones of Nayarit and Jalisco. Further research with microsatellites in crocodiles need an increased sample size and data on morfometric variables of individuals.

Key words: *C. acutus*, microsatellites, DNA, heterozygosis, crocodiles.

INTRODUCCIÓN

El Orden *Crocodylia* se encuentra representado en México por tres especies: *Crocodylus acutus* (cocodrilo de río), *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) y *Caiman crocodilus fuscus* (caimán). El *Crocodylus acutus*, también conocido como cocodrilo narigudo o cocodrilo americano, se distribuye por las costas del Pacífico y el Atlántico desde los Estados Unidos de Norteamérica y México, hasta Colombia a través del Caribe y la Isla de Pinos.

El cocodrilo es un recurso muy cotizado internacionalmente principalmente por el valor de su piel; su caza furtiva, deficiente manejo, falta de regulación, poca vigilancia, sobreexplotación y fragmentación del hábitat a la que fue sujeta la especie, trajo como consecuencia un rápido descenso de las poblaciones silvestres.

Con el fin de conservar algunas poblaciones silvestres, el Gobierno Federal, declaró en 1970 la veda total permanente, y se iniciaron distintos programas de conservación y reproducción de cocodrilos en los estados de Campeche, Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Colima. Aunado a lo anterior, algunos gobiernos estatales y municipales decretaron como áreas naturales protegidas aquellos sitios que poseían una importante superficie de hábitat adecuado para la conservación de estos organismos. Actualmente, el cocodrilo de río recibe protección en el territorio nacional al estar catalogado por la NOM-059-SEMARNAT-2001 como especie amenazada, y su comercio internacional está restringido al haberse incluido en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestre (CITES). Hasta el momento no se han reconocido subespecies del cocodrilo de río; sin embargo, su localización geográfica es extensa entre poblaciones de Florida y la costa del Pacífico, y se teme su hibridización con *C. moreletii* (Ray *et al.*, 2004).

En Estados Unidos de Norteamérica existen varios trabajos enfocados al estudio de la evolución molecular del lagarto americano (*Alligator mississippiensis*), siendo éste el más estudiado del mundo. Sin embargo, en nuestro país, si bien existe un Proyecto Nacional para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Cocodrilos (COMACROM) (SEMARNAP, 1999), cuyos objetivos son poner en práctica una estrategia que permita y asegure la conservación de los cocodrilos como recurso natural renovable, no hay hasta el momento

estudios genéticos que permitan conocer la variabilidad genética de la especie *Crocodylus acutus*.

El estudio fue realizado con ejemplares *C. acutus*, del Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara en Puerto Vallarta. En esta investigación se realizó por primera vez un estudio de la genética poblacional del cocodrilo de río en nuestro país, con el fin de establecer bases sólidas que permitan evaluar varias poblaciones.

Este estudio abarca nueve capítulos, el primero comprende los antecedentes de la especie, así como aspectos generales sobre su diversidad genética, y la base de los estudios genéticos en poblaciones y en cocodrilos; presentando también, los parámetros establecidos para la medición de la diversidad genética. En el segundo capítulo se presenta el planteamiento del problema de esta investigación; en el tercero, se formulan el objetivo general y los específicos, así como la hipótesis de trabajo; el cuarto, comprende los materiales y métodos utilizados para el desarrollo de la investigación; en el quinto, se presentan los resultados obtenidos en cada paso de la investigación; en el sexto, se desarrolla la discusión de los resultados, haciendo un análisis comparativo con estudios similares; en el séptimo, se formulan las conclusiones a las cuales se arribó; en el octavo, se señala la literatura citada a lo largo del trabajo, y finalmente en el noveno se presentan los anexos inherentes a la metodología de la investigación; esto es, los registros empleados para la toma de datos de campo, y las técnicas de laboratorio empleadas para la extracción y amplificación del ADN.

I. ANTECEDENTES

1. ORÍGENES Y CLASIFICACIÓN DE LOS COCODRILOS

Los reptiles aparecieron en la tierra hace 300 millones de años (finales del paleozoico), a partir de un grupo de anfibios. De este grupo evolucionaron varias estirpes denominadas arcosaurios, que originó a los dinosaurios y los primeros organismos en forma de cocodrilos, hace unos 245 millones de años en la era Mesozoica (Era de los reptiles) (Cifuentes y Cupul, 2004).

La Clase *reptilia* en la actualidad está dividida en cuatro Órdenes que comprenden (Weichert, 1966): 1) tortugas y galápagos, 2) caimanes, cocodrilos y lagartos, 3) serpientes y 4) tuátara.

Los cocodrilos se ubican en la Subclase *Archosauria* y Orden *Crocodylia*, que para su estudio, se encuentran clasificados en tres Familias y ocho Géneros, las cuales se mencionan a continuación (Talpin 1984; Janke y Arnason, 1997; Glenn *et al.*, 1998; Chung-fai Yau *et al.*, 2002; Brochu 2003; Cifuentes y Cupul, 2004; Janke *et al.*, 2005; Yi-Quan Wang *et al.*, 2006; Martin, 2008):

- *Alligatoridae* con 4 géneros (*Alligator*, *Caiman*, *Melanosuchus*, *Polaesuchus*).
- *Crocodylidae* con 2 géneros (*Crocodylus* y *Osteolaemus*).
- *Gavialidae* con dos géneros (*Gavialis* y *Tomistoma*).

2. COCODRILO DE RÍO (*Crocodylus acutus*)

Entre los nombres comunes que se emplean para denominar a este cocodrilo están: Cocodrilo americano, Crocodile d'Amérique, Caimán de Aguja, Central American alligator, Cocodrilo de Río, Crocodile à museau pointu, Lagarto Amarillo, Lagarto Real, Caimán, South American alligator, American saltwater crocodile (Crocodilian Species List, 2006). En su clasificación, el cocodrilo de río cuenta con algunos sinónimos como *Crocodylus acutus* y *Crocodylus biscutatus* de Cuvier (1807), *Alligator lacordairei* de Borre (1868), los *Crocodylus* mexicanos, *Crocodylus pacificus* y *Crocodylus lewyanus* de Duméril y Bocourt (1870), *Crocodylus floridanus* de Hornaday (1875), y del *Crocodylus americanus* de Boulenger (1889)

(SEMARNAP, 1999). Este gran número de sinonimias se deben en mayor parte a la amplia distribución de este cocodrilo, que la ha hecho sujeto a varias redescpciones, incluso aún existe discrepancia en las opiniones de si debe o no dividirse en varias razas (Álvarez, 2001).

2.1 CARACTERÍSTICAS

El cocodrilo de río es de talla más larga que el caimán. Los machos alcanzan entre 5 y 6 metros, aunque existen reportes de ejemplares de 7.5 metros. Los animales recién nacidos miden entre 25 y 30 centímetros. Presentan un hocico notablemente alargado alcanzando una longitud de 1.75 a 2.5 veces el ancho basal del mismo. Poseen 5 dientes premaxilares, 13 maxilares y 15 mandibulares, la longitud media de los dientes premaxilares es de 1.3 a 1.5 veces más grande que el tamaño normal de los demás, además de que la sutura premaxilo-maxilar se presenta en forma de "V". Los animales muy viejos, como regla general, poseen una joroba media preorbitaria (SEMARNAP, 1999). Todos los individuos poseen de 2 a 4 escamas post-occipitales en una hilera transversal, 4 escamas nucales, en dos pares yuxtapuestos y frecuentemente con un escudo en cada lado, el cual se alinea con la hilera anterior o entre las hileras anteriores y posteriores; escamas nucales y dorsales ampliamente separadas (Fig. 1). Las escamas tienen osteodermos arreglados en 16 ó 17 hileras transversales y 4 ó 5 longitudinales con quillas poco definidas, en los costados las escamas de la hilera transversal están regularmente alineadas y usualmente poco aquilladas; no hay pliegue gular o está poco desarrollado (SEMARNAP, 1999).

En los animales viejos, la coloración dorsal es café olivo o verde olivo muy brillante, siendo más clara en juveniles, presentan flecos y manchas oscuras y el vientre no tiene marcas. Los ojos son relativamente pequeños, tienen pupila vertical y el iris de color verde azulado; la boca es amarilla (Álvarez, 2001).

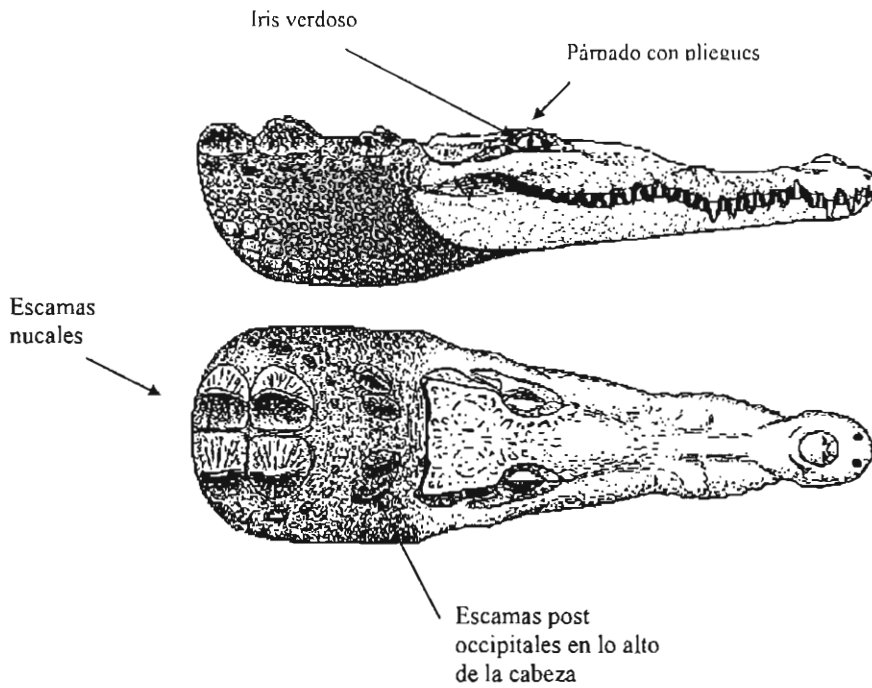


Figura 1. Características distintivas en la cabeza de *Crocodylus acutus* (Crocodilian Species List, 2006).

Los machos adultos se pueden diferenciar de las hembras por su mayor tamaño, las masas musculares de las mandíbulas, son más voluminosas y la joroba frontal más conspicua. En las hembras la cola es en algunos casos más corta y el hocico menos alargado, aunque estas características no son muy aparentes (Álvarez, 2001; Cifuentes y Cupul, 2004).

El cocodrilo de río ovoposita normalmente entre marzo y mayo, pero suelen encontrarse nidos frescos aún en febrero. En general los nidos están calculados para que los cocodrilos nazcan en las primeras lluvias y antes de las grandes crecidas. En la vertiente del Atlántico la ovoposición es un poco más tardía, posiblemente condicionada por la humedad de la región (Álvarez, 2001).

2.2 HÁBITAT

Esta especie se distribuye por las costas del Pacífico y el Atlántico desde los Estados Unidos de Norteamérica y México, hasta Colombia a través del Caribe y la Isla de Pinos (Fig. 2). En México ha sido reportado para los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo (Fig. 3). Vive en ríos caudalosos, lagos y lagunas profundas y posiblemente se le puede encontrar en pantanos, aguas salobres y saladas, como en lagunas costeras, esteros, marismas, canales, manglares e incluso en las costas y mar abierto (SEMARNAP, 1999).



Figura 2. Distribución mundial de *Crocodylus acutus* (Crocodilian Species List, 2006).

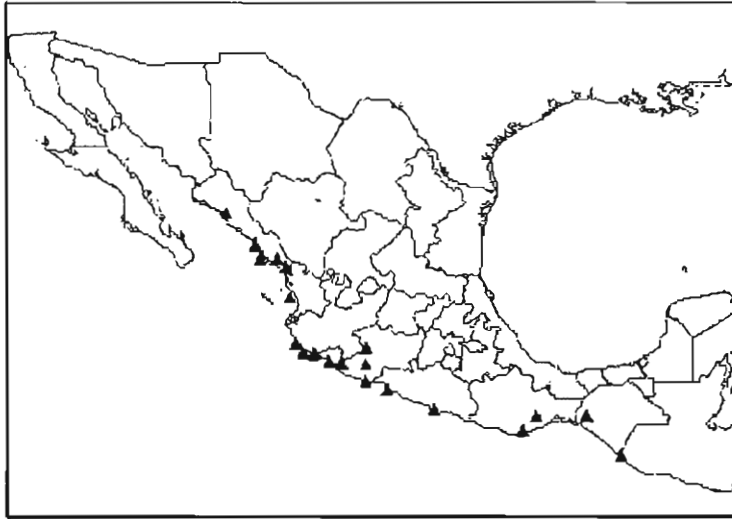


Figura 3. Distribución de *Crocodylus acutus* en México (SEMARNAP, 1999).

2.3 SITUACIÓN ACTUAL EN MÉXICO.

Hace más de un siglo los cocodrilos comenzaron a estar amenazados por la cacería. Sus peculiares pieles originaron que los pescadores de Tabasco, Yucatán y otras regiones empezaran a considerar la caza de cocodrilos como actividad productiva. La caza desmedida de cocodrilos en México ocasionó que las poblaciones México disminuyeran sensiblemente, hasta llegar a una situación crítica durante los años de 1930 a 1950 en que la cacería llegó a su pico (González y Cavazos, 2006).

Otros factores asociados a la disminución de los cocodrilos han sido y son actualmente, la deforestación, contaminación industrial, explotación ilegal de plantas y animales, y destrucción del hábitat (Valdez *et al.*, 2006). Cada año un mayor número de áreas de reproducción de estos reptiles, como pantanos, ciénagas, ríos, estuarios y vegetación ribereña son transformadas. En la mayoría de estos ecosistemas casi nunca es considerado el valor que pueden tener los espacios para la cría de cocodrilos y otras especies. Aún hoy en día, numerosas áreas de refugio, reproducción y alimentación de cocodrilos siguen siendo catalogadas erróneamente como tierras ociosas cuyo mejor fin es transformarlas (SEMARNAP, 1999).

Escobedo (2004) menciona que la conservación se ha convertido en la estrategia principal y de mayor relevancia para el mantenimiento y la viabilidad de las poblaciones naturales que han sido sobreexplotadas. A diferencia de otras especies de fauna silvestre, los cocodrilos tienen la posibilidad de soportar programas de conservación y manejo basados en un aprovechamiento económico, de tal manera que permiten integrar la investigación y el manejo de sus poblaciones silvestres con la conservación de sus hábitats y el desarrollo rural de los humedales (Kushlan, 1988). Sin embargo, el desconocimiento de los beneficios que pueden brindar las especies de cocodrilos, en términos económicos y ecológicos a las comunidades aledañas, son el mayor obstáculo para el manejo y conservación de sus poblaciones.

En México existe una veda permanente de las tres especies desde 1970, como ya se ha mencionado y en 1994 la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2001, determinó como raras a las especies del género *Crocodylus*, así como especie sujeta a protección especial que podría permitir su uso bajo normas estrictas de protección a la del género *Caiman*. La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestre (CITES) establece que el cocodrilo de río se encuentra en el Apéndice I.

2.4 IMPORTANCIA DE LA ESPECIE

a) ECOLÓGICA

Los cocodrilos desempeñan un papel de suma importancia en el equilibrio de los humedales como depredadores que controlan las poblaciones de animales que coexisten con él y mantienen o favorecen la circulación de la energía dentro de la red trófica (SEMARNAP, 1999). Por lo tanto la conservación de las distintas especies de cocodrilos y su hábitat se justifica de manera amplia, porque su eliminación dentro del hábitat desequilibraría otras poblaciones animales. Además, los cocodrilos incorporan nutrientes al medio acuático a través de las heces producidas por la digestión de su alimento.

Por otra parte, en lo que se refiere a estructura del hábitat, se podría decir que los cocodrilos actúan como un tipo de máquina “trascabo”, ya que en su movimiento habitual dentro de su territorio forma surcos que permanecen durante largo tiempo, aun en época de sequía formando los llamados “gator holes” o pozas de lagarto. Estas pozas tienen la peculiaridad de proporcionar refugio acuático a una vasta infinidad de peces, cuando desciende el nivel agua.

Otra contribución de los cocodrilos a mantener la estructura de distintos hábitat es por medio de su trabajo como depredador regulando en las poblaciones animales la permanencia de animales enfermos o viejos (Cifuentes y Cupul, 2004).

Los cocodrilos no solo establecen relaciones de depredación en su entorno, con el pez mosquitero, por ejemplo establece una relación de mutualismo pues este pez se introduce al hocico del reptil para tomar los restos de comida, que se encuentran entre los dientes, y como consecuencia, el cocodrilo recibe una limpieza en la cavidad oral (Cifuentes y Cupul, 2004).

b) ECONÓMICA

Actualmente existe un amplio mercado para los productos obtenidos a partir de cocodrilos, debido a que su piel es gruesa y durable, tienen una gran demanda en la industria peletera internacional para la elaboración de zapatos, bolsas, cinturones, portafolios y billeteras (SEMARNAP, 1999). La carne de estos reptiles es considerada como una alternativa de alimentación, tiene un valor nutricional de 20% de proteína, 8.1% de carbohidratos, 65.4% de humedad, 0.75% de minerales, así como 6.22% de grasa y 1.32% de colesterol. Además, en fechas recientes este tipo de carne tuvo mucho éxito en países de Europa, debido a la crisis de la enfermedad de las “vacas locas” (Cifuentes y Cupul, 2004).

Por otra parte, las granjas de cocodrilos generan importantes ingresos vía ecoturismo ya que es un atractivo poco usual, lo cual hace que sean visitadas por muchas personas (SEMARNAP, 1999). Así por ejemplo, Abadía (2002) determinó que el valor ecoturístico de *C. acutus* supera en gran proporción su valor comercial por medio de la piel.

Por otro lado, la pérdida de los cocodrilos reduce el valor de los humedales (Escobedo, 2004).

c) CULTURAL

Entre las antiguas culturas mexicanas, los aztecas consumían los huevos y la carne de acuetzpalín y le atribuían a las vísceras propiedades medicinales. Los mayas continuamente asociaron a Itzam Can Ain (monstruo cocodrilo de la tierra) con símbolos de fertilidad del agua y la tierra, seguramente tenían un profundo conocimiento de su papel ecológico. Actualmente algunos grupos étnicos como los lacandones consumen la carne y los huevos de estos reptiles; estos grupos curten las pieles con una mezcla a base de corteza de caoba y mangle, además de

conocer con detalle su historia natural. Por otra parte, en Oaxaca consideran al caimán como el protector del grupo o comunidad, por lo cual lo respetan y veneran (SEMARNAP, 1999; Cifuentes y Cupul, 2004).

En la actualidad, la utilización del cocodrilo en las principales fiestas de algunas comunidades rurales del sureste, es una actividad común y lo ofrecen como un platillo tradicional y en diversas regiones se le atribuyen propiedades curativas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, reumas, impotencia sexual y asma, entre otras; contribuyendo a que se le capture con estos fines (SEMARNAP, 1999).

3. DIVERSIDAD DE POBLACIONES

En la actualidad se define a la biodiversidad como toda variación de la base hereditaria en todos los niveles de organización, desde los genes en una población local o especie, hasta las especies que componen toda o una parte de una comunidad local y finalmente en las mismas comunidades que componen la parte viviente de los múltiples ecosistemas del mundo (Núñez *et al.*, 2003). La diversidad es una característica de las múltiples formas de adaptación e integración de una especie a los ecosistemas de la tierra y no un recurso que se deba explotar (Solbrig, 1994).

La biodiversidad es el resultado de procesos y patrones ecológicos y evolutivos irrepetibles. El término biodiversidad puede entenderse como una entidad formada por tres conceptos fundamentales: la diversidad de especies, la diversidad ecológica y la diversidad genética.

La *diversidad de especies* es la variabilidad de especies que existen en nuestro planeta. Los científicos consideran que en la Tierra puede haber entre 40 y 80 millones de especies diferentes, de las cuales sólo unas cuantas han sido identificadas (Toledo, 1999).

La *diversidad ecológica* por su parte, se establece por la multitud de medios donde estas especies se establecen formando comunidades y ecosistemas. En la Tierra existen biomas, es decir, regiones habitadas por ciertos tipos de vida entre las que podemos encontrar: los bosques, los desiertos, la tundra, el arrecife o los pastizales. La conservación de los ecosistemas naturales es una de las mejores formas para aminorar los altos niveles de extinción de las especies que se observan en nuestros días. Estos niveles de extinción crecen aceleradamente gracias, principalmente, a la actividad humana que transforma los hábitats naturales (Toledo, 1999).

La destrucción de los ecosistemas naturales, además de afectar directamente a la biodiversidad, afecta las funciones que tienen los ecosistemas mismos, funciones como: la regulación del clima, la regeneración y conservación de suelos, el mantenimiento de la composición química de gases en la atmósfera, la regulación de los ciclos del agua (hidrológicos), la regulación y reciclaje de la materia orgánica en descomposición, el control natural de plagas y el reciclaje de nutrientes (Toledo, 1999).

La *diversidad genética* es aquella que se forma por la variabilidad de información genética que tienen los organismos de una misma especie. Puede ser considerada como base de la evolución de los organismos. Cada organismo posee una cierta información genética, la diversidad genética representa la variación de esta información heredable dentro y entre poblaciones de organismos, esencialmente, depende de la variación en la secuencia de bases del genoma (Toledo, 1999).

La función de la diversidad genética (carga genética, expresada o no en los individuos de una especie) es la de mantener un reservorio de condiciones (de variación) de respuesta al medio, que permita la adaptación y la supervivencia. Cuando en una especie la variabilidad genética es grande, sus posibilidades de sobrevivir o de sobreponerse a una crisis son mayores; así mismo, cuando en una especie hay muy pocos organismos diferentes entre sí, su fortaleza para resistir las adversidades disminuye. Esto se explica porque cuando hay pocos organismos o estos son poco diversos, al cruzarse entre sí, no tienen a mano una gran diversidad de genes, y cuando existe un gen adverso o defectuoso, hay pocas posibilidades de suplirlo y se manifestará cada día más en la población (Toledo, 1999).

En un sentido amplio, la diversidad genética abarca todos los niveles de la jerarquía ecológica y taxonómica. Dentro de las especies, existen tres niveles (Dirzo y Raven, 2003): dentro de los individuos, entre individuos de una población, y entre poblaciones. La pérdida de diversidad genética tiene consecuencias graves.

Garner *et al.* (2005), sugieren que la depauperización de las poblaciones reduce la habilidad para adaptarse a cambios ambientales. La pérdida de variación genética reduce la capacidad de poblaciones pequeñas de evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales.

Desde 1960 la teoría genética de poblaciones ha mostrado que la cantidad de variaciones genéticas depende de varios factores; más allá del tamaño de la población, estos factores pueden ser la selección, el número de *loci* subyacentes de los rasgos, los efectos o arreglos probables de nuevas mutaciones, así como el estrés genético como el ambiental (Willi *et al.*, 2006).

La información global sobre la diversidad genética en cocodrilos es extremadamente limitada. Evidencias en variación genética medida por medio de isoenzimas, muestran que la diversidad genética no varía al azar entre las poblaciones y especies (Dirzo y Raven, 2003).

Brochu (2003), al realizar estudios de filogenética basados en la historia de los cocodrilos, resalta que los integrantes de la familia *Crocodylus* pueden ser tomados como fósiles vivientes, que presentan poca divergencia entre sí, concluyendo que la diversidad de los cocodrilos era mayor en el pasado que ahora, debido a la presencia de climas calurosos que permitían una distribución mayor para los grupos, mismos que no eran mayores de cinco animales (con algunas excepciones); sin embargo, los fósiles de cocodrilos no son más diversos que las especies de ahora.

Garner *et al.* (2005) en su estudio sobre diversidad genética en mamíferos, concluyeron que la constante reducción de la diversidad genética de las poblaciones es consecuencia de las amenazas demográficas a las que están sujetas las especies. Por otro lado, Platt y Thorbjarnarson (2000b) en un estudio de poblaciones en Belice sobre el *C. acutus*, encontraron que existe poca evidencia sobre la recuperación de la especie en zonas pequeñas, pero concluyeron que Belice cuenta con una población de tamaño significativo y que juega un papel muy importante en la dinámica vital de la metapoblación. Adicionalmente, recomiendan nuevas estrategias de conservación para la especie.

En otro estudio realizado por Platt y Thorbjarnarson (2000a) para identificar las poblaciones de *C. moreletii*, señalan que debido a la caza y protección de esta especie es posible que se haya extendido a zonas donde se encontraba *C. acutus*.

En México se han realizado algunas evaluaciones de poblaciones de cocodrilos; en Michoacán, Cedeño (1995) llevó a cabo un estudio sobre la distribución y la situación actual de la especie en el estado. En la costa de Jalisco, Valtierra y García (1997) han realizado conteos sistemáticos desde 1996 de la población presente en la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala; en Colima, Castillo (1997) realizó una evaluación de dos poblaciones silvestres. Navarro (1999) efectuó recorridos en la parte sur del estado localizando poblaciones silvestres

de la especie, haciendo una correlación de éstas y las modificaciones del hábitat para definir sitios de atención urgente. Por su parte, Sigler (1995) ha realizado evaluaciones en el estado de Chiapas. Así mismo, Remolina *et al.* (1990) y Domínguez (2002) han llevado a cabo estudios en Quintana Roo. Finalmente, para el estado de Sinaloa, León *et al.* (1997), han trabajado en la Laguna de Chiricahueto evaluando la población que ahí habita y han colectado algunos huevos para incubarlos en condiciones controladas, liberando posteriormente en el mismo sitio de colecta a los neonatos obtenidos (SEMARNAP, 1999).

Actualmente, en el estado de Nayarit se está realizando un diagnóstico de poblaciones de *C. acutus*, por el Biólogo Helios Hernández (sin publicar).

4. ESTUDIOS GENÉTICOS EN POBLACIONES

La genética molecular nos puede auxiliar en la identificación de individuos con valor genético sobresaliente, ayudándonos a monitorear cambios genéticos en hatos o poblaciones; sobre todo de aquellas especies en peligro o riesgo de extinción (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

En los inicios de 1980, los genetistas comenzaron a emplear tecnologías de ADN recombinante, como un acercamiento al análisis de mapas clonados de secuencias de ADN de cromosomas específicos. La mayoría de estas secuencias no eran genes, sino marcadores de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), o polimorfismo de base única (SNPs), entre otros. Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (isoenzimas) y fragmentos de ADN (nuclear o mitocondrial) de genes conocidos, cuando sólo es posible situar un *locus* en un cromosoma o fragmentos de secuencia y función desconocida (Dessauer *et al.*, 2002, Claos, 2006; Klung *et al.*, 2006).

Mientras estas técnicas se desarrollaban, Fred Sanger y sus colegas (1977) exploraron el camino de la genómica usando nuevos métodos para analizar secuencias del ADN (secuencia de 5400 nucleótidos del virus Φ X174). Con cientos de genomas tanto eucariotas como procariontes estudiados, ahora la genómica se expande a nuevas metas; en éstas se enmarcan nuevos caminos (Klung *et al.*, 2006): la genómica estructural (construcción de secuencias, localización y construcción de mapas genéticos), genómica funcional (estudio funcional de los genes, su regulación y productos), y genómica comparativa (comparación de secuencias de genes o proteínas

de diferentes genomas para dilucidar la relación funcional y evolutiva, establecer variaciones genéticas entre especies).

Los trabajos donde se han empleado microsatélites en estudios de diversidad genética son relativamente recientes, por lo que caracterizar las poblaciones nativas o locales mediante este recurso será de gran utilidad, al permitir diferenciar y estimar la distancia genética entre razas, para conservar la diversidad genética al momento de emplear sistemas de conservación (Yue *et al.*, 1999).

4.1 MARCADORES GENÉTICOS

Desde la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se ha desarrollado una serie de técnicas utilizadas para los estudios de variabilidad genética en las especies animales. Entre estas técnicas se cita el uso de los marcadores genéticos, la cual se basa en la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (*fingerprint markers* o huellas digitales moleculares) (Dodgson *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista molecular, la variación genómica, también es denominada como “polimorfismo”, que deriva de los cambios espontáneos del ADN (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). En tanto que, un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. Los marcadores se pueden clasificar en tres:

4.1.1. Marcadores basados en la hibridación del ADN:

- a) RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN. Este tipo de estudio involucra la detección de un segmento específico (marcador molecular) en el ADN de estudio, por hibridación con un fragmento marcado radiactivamente de secuencia complementaria al marcador (sonda). Tienen la ventaja de ser altamente reproducibles, codominantes y multialélicos; pero cuentan con la desventaja de ser muy laboriosos, difíciles de automatizar y requieren de infraestructura adecuada para trabajar con sustancias radioactivas que lo hace una técnica relativamente cara (Picca *et al.*, 2002).
- b) Los minisatélites o VNTRs (*variable number tandem repeats*), son un número de secuencias de tamaño variable, de 10 a 60 nucleótidos. El número de veces que se

repite el motivo de repetición varía mucho según la localización, lo que los hace muy útiles como marcadores genéticos. Una ventaja es que además de explorar el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción en cada *locus*, también se utilizan en el número y distribución de estos *loci* a lo largo del genoma (Tautz, 1989; Weber y May, 1989; Fries *et al.*, 1990; Picca *et al.*, 2002).

4.1.2. Marcadores basados en la amplificación del ADN

La amplificación del ADN se realiza mediante la reacción de PCR, técnica que se basa en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN, que utiliza dos oligonucleótidos llamados “cebadores” o “primers”. Para que exista amplificación del fragmento es imprescindible que ambos oligonucleótidos hibriden en secuencias complementarias presentes en las hebras del ADN en estudio, creando la necesidad de disponer de información previa de la secuencia; esto dio lugar a (Gómez, 1998):

- a) RAPDs (*random amplified polymorphic DNAs*) o fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente; que se basa en la utilización de un único oligonucleótido de 10 pares de bases (bp) que hibrida al azar en el ADN.
- b) DAF (*DNA amplification fingerprinting*) y AP-PCR (*arbitrary primer PCR*) son técnicas similares a RAPDs. DAF involucra el uso de “primers” arbitrarios de longitud tan corta como 5 pb. AP-PCR utiliza “primers” ligeramente más largos que la técnica anterior (aprox. 20 pb).
- c) *Microsatélites* o *STRs* (*short tandem repeats*): algunos autores los denominan también VNTRs como los minisatélites, son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tandem de unos pocos pares de bases (1 a 6) flanqueadas por secuencias de copia única.

4.1.3. Marcadores mixtos

- a) AFLP (*amplified fragment length polymorphisms*) o polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de ADN, que pueden considerarse como una combinación de RFLP y RAPDs (Picca *et al.*, 2002).

Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (*loci* de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Claus, 2006).

Los microsatélites o STRs (*short tandem repeat*), se han elegido como marcadores de gran utilidad para detectar flujo génico y estructuración poblacional a gran escala en especies con poblaciones fragmentadas o en regresión. El alto nivel de polimorfismo que se detecta con su uso, permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Resultan útiles para definir un único genotipo *multilocus*, de partículas de interés en donde se requiera un escala muy fina de resolución y en los cuales otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Contreras-Díaz *et al.*, 2006).

Los microsatélites se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma, son muy abundantes, exhiben gran polimorfismo y son fáciles de identificar; estas circunstancias hacen que se utilicen como marcadores genéticos. Incluso los mapas de ligamiento (mapa de las posiciones relativas de los *loci* en un cromosoma basándose en las frecuencias con que dichos *loci* se heredan juntos) de la mayoría de los mamíferos, se están construyendo utilizando microsatélites como marcadores genéticos (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989). Estos marcadores son los que han despertado más interés para realizar pruebas de identificación individual, control de paternidad y para la caracterización de poblaciones.

Las secuencias microsatelitales se han observado en todos los genomas eucariotas y, en muy poca medida, en los procariotas (Hamada *et al.*, 1982; Tautz y Renz, 1984; Weber y May, 1989). Se ha calculado que existen al menos 35,000 secuencias de este tipo en el genoma haploide humano distribuidos al azar, por lo que se cree que se encuentran cada 100,000 pb o 100 kilobases (kb) (Weber, 1990). En los individuos eucariotas se puede encontrar, al menos, una secuencia microsatélite cada 10,000 pb (Tautz, 1989). Parece ser que se encuentran uniformemente distribuidos en los cromosomas (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989), aunque se ha observado que están poco representados en las regiones teloméricas y centroméricas, tanto en el *Homo sapiens* (Stallings *et al.*, 1991) como en animales domésticos (Winter *et al.*, 1992).

Los microsatélites, de acuerdo a su estructura, pueden ser de tres tipos (Weber, 1990):

- 1) Perfectos, que contienen únicamente un motivo nucleotídico repetido n veces, Ej. (Adenina-Citosina)₉
- 2) Imperfectos, que contienen una secuencia no repetitiva intercalada entre las repeticiones. Ej. (Citosina-Adenina)₂Adenina-Adenina(Citosina-Adenina)₁₂
- 3) Compuestos, que están constituidos por dos o más tramos de motivos repetitivos diferentes. Ej. (Citosina-Timina)₄(Guanina-Timina)₂Citosina-Timina-Adenina-Timina(Guanina-Timina)₁₅

Los microsatélites se empezaron a utilizar de forma masiva para la construcción de mapas de ligamiento de varias especies de mamíferos y en 1992 se comenzaron a obtener resultados de estos mapas en el genoma humano y en el de ratón (Dietrich *et al.*, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992). También se han utilizado para localizar varias alteraciones genéticas humanas, y han acelerado la identificación de muchas lesiones en el genoma humano. Otros empleos de los microsatélites son la medicina forense, pruebas de identidad y análisis de la estructura de la población (Anónimo, 2006).

En los estudios de genética de poblaciones, los marcadores permiten la identificación de cada alelo por *locus*, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o entre individuos, así como también realizar análisis filogenéticos y de estructura de la población (Bowcock *et al.*, 1994; Ponsuksili *et al.*, 1999, citado por Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Los procedimientos más utilizados para determinar el análisis de ligamiento son el cálculo del índice de heterocigosidad (H) y el contenido de información polimórfica (PIC). La heterocigosidad es la proporción de individuos que son heterocigotos en la población. El PIC está indicado para medir la capacidad informativa de un marcador genético polimórfico (Botstein *et al.*, 1980). Los microsatélites son marcadores utilizados para la construcción de mapas genéticos que pueden usarse, a su vez, para buscar QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos) asociados a caracteres económicamente importantes (Georges *et al.*, 1995; Womack y Kata, 1995).

La mayoría de los microsatélites son neutros con respecto a la selección y esto los hace útiles para realizar estudios de variación genética y de relaciones evolutivas entre poblaciones. La variabilidad genética se puede definir como “la capacidad genética para variar”, y por ende, la

capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así, como la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000).

Los microsatélites se han empleado en trabajos muy diversos como en la caracterización racial, estableciendo relaciones entre diversas razas bovinas (Arranz, 1994; Machugh *et al.*, 1994; Moazami-Goudarzi *et al.*, 1994; Moazami-Goudarzi *et al.*, 1997) o en poblaciones de abejas melíferas (Estoup *et al.*, 1994; Estoup *et al.*, 1995) o en estudios del grado de hibridación entre especies muy relacionadas (Gotelli *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1994) También se ha visto que son útiles para la valoración de la variación genética total de una población (Gotelli *et al.*, 1994; Paetkau y Strobeck, 1994; Taylor *et al.*, 1994). Pueden usarse para calcular el tamaño efectivo de una población (Allen *et al.*, 1995), y también para estudiar la subestructura de una población, incluyendo el grado de migración entre subpoblaciones (Gotelli *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1995), y las relaciones genéticas entre las diferentes subpoblaciones (Berumen *et al.*, 1994; Bowcock *et al.*, 1994; Estoup *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1995; Lade *et al.*, 1996).

Los métodos basados en distancias asignan el individuo a la población genéticamente más cercana o próxima; para ello se requiere definir una distancia entre el individuo y la población. Se han definido numerosas distancias genéticas; sin embargo las podemos agrupar en dos grandes bloques: las distancias entre poblaciones y las distancias entre individuos (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

5. ESTUDIOS GENÉTICOS EN COCODRILOS

Nuestro conocimiento sobre el estatus actual de las poblaciones y ecología de cocodrilos es pobre. Dever *et al.* (2002), mencionan que los estudios previos revelan que la diversidad genética entre las poblaciones de lagartos y cocodrilos es baja. Sin embargo, en su estudio encontraron que los cocodrilos de pantano (*C. moreletti*) presentan una alta heterocigosidad y que existe una variación entre las distintas poblaciones que observaron.

Los microsatélites permiten estimar de forma precisa la variación genética de una población (Dever *et al.*, 2002). Así, las poblaciones de lagartos en Norteamérica pudieron distinguirse entre sí, a través de los microsatélites determinados en los estudios de Glenn *et al.* (1998) y Davis *et al.* (2002) se observó una gran diferencia entre las poblaciones (Dessauer *et al.*, 2002).

Glenn *et al.* (1998) ilustraron el potencial de los microsatélites para análisis genéticos de poblaciones de cocodrilos. Reportaron diferencias importantes entre poblaciones de *A. mississippiensis* entre las poblaciones de Florida y Louisiana, en los Estados Unidos de Norteamérica.

Ray *et al.* (2004) en su estudio encontraron evidencias de hibridación del *C. moreletti* y *C. acutus* en Belice, y mencionan que este hibridismo ha sido reportado anteriormente en estudios realizados por Ross y Ross (1974), y Ross y Mayer (1983). Entre los hallazgos importantes de su estudio, destaca que no se sabe si las evidencias encontradas son producto de una primera hibridación o si provienen de generaciones anteriores, concluyendo que esta información debe ser tomada en cuenta al momento de desarrollar nuevos protocolos de conservación y manejo de ambas especies (Ray *et al.*, 2004).

Russello *et al.* (2006) realizaron un estudio en el *C. porosus* (cocodrilo de aguas saladas) y señalan que los porcentajes de hibridación con otras especies de cocodrilos (*C. mindorensis*, *C. novaeguineae*, y *C. siamensis*) en Palau es casi nula, descartando la posibilidad de una relación entre las especies introducidas y el *C. porosus*

Se han realizado algunos estudios de secuencias de ADN, y la conclusión a la que se ha llegado es que existe menos de 1% de diferencia en las secuencias encontradas en el *Crocodylus rhombifer* y *C. acutus* (Gatersy *et al.*, 1993; Mindell *et al.*, 1996).

Por otro lado, Davis *et al.* (2002) en su estudio en *Alligator mississippiensis* en 12 localidades distintas de Norteamérica, encontraron que entre más cerca están las poblaciones estudiadas, menor es la distancia genética entre ellas; además señalan que entre los distintos grupos las diferencias son en menor porcentaje, que entre los individuos de cada grupo, concluyendo que esto se debe a que los ríos en donde se ubican son del mismo sistema de drenaje para las distintas poblaciones.

Ryberg *et al.* (2002) realizaron otro estudio en *A. mississippiensis* en 6 localidades distintas (tres costeras y tres en la zona central de Norteamérica); no pudieron comprobar las diferencias en la estructura genética de las poblaciones por su grado de aislamiento por la convergencia de los ríos. Sin embargo, presentaron evidencia suficiente para probar una subdivisión de la población estudiada.

Glenn *et al.* (2002) observaron también en *A. mississippiensis* por medio de ADN mitocondrial, una baja variación genética dentro de las poblaciones estudiadas, pero una variación significativa entre las poblaciones, debido a su separación territorial.

Debido a que el desarrollo de “primers” es un proceso de gran costo y mucho tiempo, los investigadores han intentado utilizar “primers” previamente diseñados en especies cercanas. Algunos de estos estudios han mostrado éxito inclusive en especies con mayor distancia (Glenn *et al.*, 1996). Dever y Densmore (2001) probaron la utilidad de marcadores diseñados para *C. johnsoni*, *C. porosus* (cocodrilo de aguas saladas), *C. rhombifer* (cocodrilo cubano), y *C. moreletti* (cocodrilo de pantano), concluyendo que los marcadores de *C. johnsoni* fueron los únicos en amplificar las muestras de ADN del cocodrilo de pantano; además de la posibilidad de aplicar esta técnica en otras poblaciones de *Crocodylus*. Por su parte, Zucoloto *et al.* (2002) al evaluar la variación microgeográfica del Yacare (*Caiman latirostris*) de Sudamérica, se encontraron con el problema de que de los marcadores desarrollados para *A. mississippiensis* de Glenn *et al.* (1998), únicamente 4 fueron funcionales para la especie de estudio. De ahí que tuvieron que desarrollar nuevos marcadores específicos para *C. latirostris*.

6. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética es un factor clave en la evolución y manejo de las poblaciones. Cómo se origina y mantiene la variabilidad genética en las poblaciones, depende en gran medida de la posición filética de los grupos a los cuales pertenezcan (Camarillo *et al.*, 1991).

La variación genética se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies. Las diferencias genéticas que ocurren naturalmente entre los organismos dentro de las especies se llaman polimorfismos genéticos, los cuales se acumulan hasta que se tornan abundantes entre las especies, en las cuales se denominan divergencias genéticas (Anónimo, 2007).

Existe una gran diversidad de estadísticas para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información en términos más manejables. Es importante tomar los tamaños de los fragmentos como alelos en cada *locus* de microsatélite empleado; tomando el número de alelos en cada *locus* se obtendrán las frecuencias alélicas, calculadas como frecuencias relativas al dividir el número para cada alelo entre el total de alelos presentes en cada *locus*, n_i/N (Nei, 1977).

Los métodos estadísticos más empleados son, de acuerdo con Arenguen-Méndez *et al.* (2005) y Chakraborty y Jin (1993):

- a) Porcentaje de *loci* polimórficos: un *locus* se considera polimórfico si podemos detectar más de un alelo en una población. Generalmente el criterio más utilizado es el del 1%. El polimorfismo será medido de acuerdo al número total de alelos presentes por *locus* y su distribución en las poblaciones estudiadas por medio de histogramas.
- b) El número medio de alelos por *locus*: indica el número medio de alelos que presenta un *locus* en una población. Sin embargo, dicha medida depende mucho del número de individuos analizados, ya que cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios.
- c) Heterocigosidad observada (HO): frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los *loci*. Se calcula por cómputo directo.
- d) La heterocigosidad esperada (HE): probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes.
- e) El índice de contenido polimórfico (PIC): este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad de que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo (Botsein *et al.*, 1980).

7. PARÁMETROS Y VARIABLES PARA MEDIR LA DIVERSIDAD GENÉTICA

A continuación se describen los parámetros y variables para la medición de la diversidad genética, con sus formulas correspondientes (Balzarini *et al.*, 2006)

a) Frecuencias alélicas

Número de variantes alélicas presentes en una muestra. Siendo la medida de diversidad A-1, ya que en una población monomórfica (homocigótica) la medida sería A-1=0.

b) Proporción de loci polimórficos

Ocurrencia de las diferentes formas genéticas de un *locus* en la misma población, se refiere a la presencia de dos o más alelos en un *locus*. Considerando un *locus* polimórfico si se observan variaciones en la población para ese *locus* y si la frecuencia del alelo más común es menos o igual a 0.99 o 0.95, en un rango que 0 se refiere a que no hay variación y 1 marca el índice mayor de variación.

$$P = x / m$$

P = Proporción de *loci* polimórfico

x = *Loci* polimórfico

m = Número total de *loci*

c) Número medio de alelos por locus

Número de alelos contabilizados en todos los *loci*, dividido por el número total de *loci*; su cálculo sólo requiere contabilizar los alelos por *locus* y hacer el promedio.

d) Número de alelos efectivos (*Ae*)

Número de alelos que pueden estar presentes en una población, indica el número de alelos esperados en cada *locus*.

$$A_e = 1/(1-h) = 1/\sum p_i$$

A_e = Alelos efectivos

p_i = Frecuencia de cada alelo del *locus*

e) *Heterocigosidad*

Estima la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto para ese *locus* en la población. Representa la mejor medida de la variación genética por su precisión. Se puede estudiar como:

Heterocigosidad observada: frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en una muestra para cualquiera de los *loci*, calculándose por cómputo directo.

Heterocigosidad estimada: es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes. Esta se calcula realizando una estimación basada en el valor esperado condicional de las frecuencias alélicas (Diversidad genética de Nei). Su valor varía entre 0 y 1 (Nei, 1978).

La heterocigosis estimada para un *locus* se define como:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2$$

$$\sum_{i=1}^l p_{ii} = \text{Frecuencia de los genotipos homocigotos}$$

Si la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para el *locus* (principio que establece que la composición genética de una población permanecerá en equilibrio mientras no

actúe la selección natural), entonces la heterocigosis puede ser escrita en términos de frecuencias alélicas como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2$$

$$\sum_{i=1}^l p_i^2 = \text{Frecuencia esperada para } l \text{ genotipos homocigotas}$$

f) *Índice de Contenido Polimórfico (PIC)*

Este evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado en frecuencias alélicas) por la probabilidad que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo (Bostein *et al.*, 1980).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 - 2 \sum_{i=2}^l \sum_{j=1}^{i-1} (p_i^2 p_j^2)$$

$$p_i^2 p_j^2 = \text{Frecuencias de los alelos}$$

g) *Diversidad Genética*

Función de la heterocigosis que se calcula a partir de la suma de cuadrados de frecuencias alélicas (Balzarini *et al.*, 2006).

$$D = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2$$

h) *Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W)*

La ley de H-W asume que en una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación o migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. Cuando una población se desvía de estas proporciones se habla de desequilibrio de H-W. Éste se puede medir mediante el índice de fijación F (Wright, 1965), que se expresa para un *locus* cualquiera como:

$$F = (H_e - H_o) / H_e$$

H_e = Heterociosidad estimada

H_o = Heterocigosidad observada

Cuando el índice de fijación F es igual a cero, indica que la población está en equilibrio; mientras que si F es diferente a cero, ya sea positivo o negativo, el valor indicaría que existe un déficit o exceso de heterocigosis, respectivamente (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

i) *Distancia estándar de Nei (D_s)*

Mide el grado de diferenciación existente entre una población de la misma especie o entre especies; son estimadores del tiempo de separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes entre y dentro de las poblaciones.

$$D_s = -\ln (J_{xy} / \bar{J}_x \bar{J}_y)$$

J_x / J_y = Homocigosis medias sobre *loci* en la población X-Y.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cocodrilos actuales son los únicos reptiles vivientes que se derivaron por la línea de los arcosaurios con más de 200 millones de años, con formas fósiles que tuvieron adaptaciones en el transcurso de su historia. Sólo 8 de los 124 géneros descritos de *Crocodylia* sobreviven, con 21 especies reconocidas actualmente (Densmore, 1983). De las 32 especies, subespecies o poblaciones reguladas de cocodrilos, 19 están listadas en los CITES, Apéndice I, en tanto que el resto están listadas en el Apéndice II (declaradas en peligro de extinción; US Fish and Wildlife Service, 1994). Como ya se mencionó, el cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*) recibe protección en el territorio nacional, al estar catalogado por la NOM-059-SEMARNAT-2001, como especie amenazada, y su comercio internacional está restringido al haberse incluido en el Apéndice I de CITES.

En el Estado de Jalisco existen esfuerzos en conjunto del Centro Universitario de la Costa para la reproducción de las especies que se encuentran en peligro de extinción, fomentar la investigación científica, así como el mejoramiento de las condiciones de vida de las especies. Hasta el momento se desconoce la diversidad genética de *Crocodylus acutus*, información valiosa que permitirá hacer un uso racional en la conservación de este reptil considerado como amenazado.

Actualmente existe la necesidad del uso de marcadores genéticos polimórficos en la investigación básica de genética, población y ecología reproductiva de los cocodrilos (Glenn *et al.*, 1998). La FAO (*Food and Agricultural Organization of the United Nations*) menciona que la importancia e interés de la conservación de las especies se resumen en cuatro aspectos (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001):

- 1) Genético-productivo, donde la diversidad es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones, permitiendo su adaptación a diferentes ambientes.
- 2) Científico: el estudio de cada especie puede ser de interés para detectar genes únicos y valiosos, en el momento actual o en el futuro, en estas poblaciones.
- 3) Histórico-cultural: representa un patrimonio genético de un país.

- 4) Ecológico-ambiental, siendo los ecosistemas el resultado del equilibrio entre clima, flora y fauna, y cualquier factor que afecte alguno de sus componentes estaría atentando contra ese equilibrio, deteriorando el medio y la simbiosis ecológica.

Es necesario incluir el análisis genético de las variantes fenotípicas observadas para establecer la relación inequívoca entre fenotipo y genotipo. De esta forma, los marcadores se utilizan como herramienta para los distintos estudios de genética poblacional. A largo plazo, la variabilidad es un tesoro para las poblaciones, pues su existencia garantiza mayores posibilidades para la adaptación a nuevas condiciones ambientales.

III. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la variabilidad genética del cocodrilo de río (*C. acutus*) en una población del pacífico mexicano.

3.2. Específicos

Evaluar el funcionamiento y aplicación de los marcadores moleculares desarrollados para el cocodrilo australiano de agua salada (*C. johnsoni*) en cocodrilo de río (*C. acutus*).

Determinar el nivel de variabilidad genética en la población estudiada, utilizando marcadores por medio de microsatélites.

IV. HIPÓTESIS

Debido a las características de la población de cocodrilos de la Unidad de Manejo Animal (UMA) "Cipactli", Puerto Vallarta, Jal, que consiste en recibir y capturar ejemplares de distintas procedencias, la población presentará diferencias genéticas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. AREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara en Puerto Vallarta (Fig. 4) situado al poniente del estado de Jalisco, en las coordenadas: 20°27'00'' a los 20°59'00'' de latitud norte y los 104°55'00'' a los 105°33'00'' de longitud oeste, a una altura de 2 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el Estado de Nayarit, al sur con el municipio de Cabo Corriente y Talpa de Allende; al oriente con San Sebastián y Mascota, y al poniente con el Océano Pacífico (INEGI, 2009).

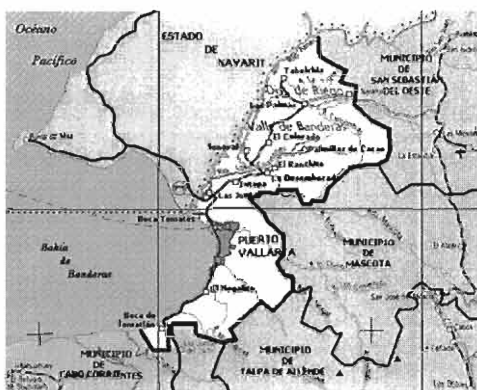


Figura 4. Puerto Vallarta, Jalisco (Enciclopedia de los Municipios de México, 2007)

El Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara es miembro activo de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de la República Mexicana, A. C., AZCARM, cuya finalidad es la de trabajar en conjunto por el desarrollo y avance de los distintos zoológicos, criaderos y acuarios del país, a través de la implementación de programas de conservación, investigación así como de la educación.

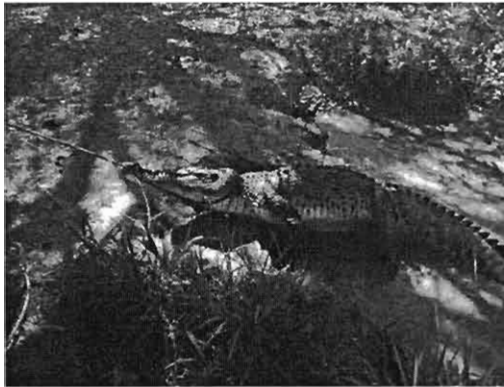
El Centro cuenta con un reptiliario (Cipactli) que funge como refugio para cocodrilos que han sido capturados tanto en zonas aledañas como poblaciones al sur y norte de Puerto Vallarta (Platanitos Nayarit, Manzanilla Jalisco).

5.2. CAPTURA DE LOS ANIMALES

Las capturas de los animales se realizó en conjunto con personal de la Delegación de SEMARNAT Nayarit, debido al conocimiento que tienen del área, en el “Reptilario Cipactli”, del Centro Universitario de la Costa, de la Universidad de Guadalajara, en Puerto Vallarta, Jalisco.

Las capturas realizadas en cocodrilos adultos y reproductores (animales de más de 1.25 m) fueron por medio de cuerdas de tensión para manejo, sogas, y ligas, de la siguiente manera:

a. Se coloca una soga por detrás del cuello del animal, procurando pasarla por una de sus extremidades anteriores. Es importante llevar al animal a una zona segura para su manejo posterior, alejado de los cuerpos de agua.



b. Se sujeta el maxilar superior del cocodrilo con una cuerda de tensión que contenga un seguro para evitar que se resbale.



c. Sin soltar la cuerda de tensión, se rodean ambos maxilares con una cuerda para cerrar la boca del animal realizando un nudo simple.

d. Una segunda soga debe ser colocada por detrás del cuello, de tal forma que cada soga pueda ser tensada en un ángulo de 45° con respecto al animal.



e. La cola debe ser sujeta por dos sogas, una en la parte anterior y otra en la zona distal de la cola; ambas sogas deben sujetarse a una estructura fija.



f. Las extremidades se sujetan entre ellas, elevándolas del piso, cuidando de no tensarlas en exceso y producir un daño al animal.

g. Una vez sujetado el animal, se le cubren los ojos con un trapo para no permitirle visibilidad alguna.



En el caso de animales juveniles, la sujeción se llevó a cabo de forma manual, sujetándolos por detrás del cuello, se les colocó una cinta adhesiva sobre los maxilares para evitar mordidas y se les transportó con ayuda de dos personas, una que lo sujetó del cuello y la parte anterior del cuerpo, y otra que contuvo la parte posterior del cuerpo y abrazaba la cola de los animales.

5.3. MUESTREO SANGUÍNEO

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular por medio de una punción de forma vertical sobre la línea media de la cabeza, delante de las escamas post occipitales. Se empleó una jeringa de 3 ml y una aguja 18 G x 38 mm, procurando no causar daño a los animales (Figs. 5a y c).

Debido al tamaño en los animales reproductores fue necesario colocar un soporte por debajo de la cabeza sobre el cuello, que permitiera mantener en extensión la zona cervical para facilitar la obtención de la muestra (Fig. 5b).



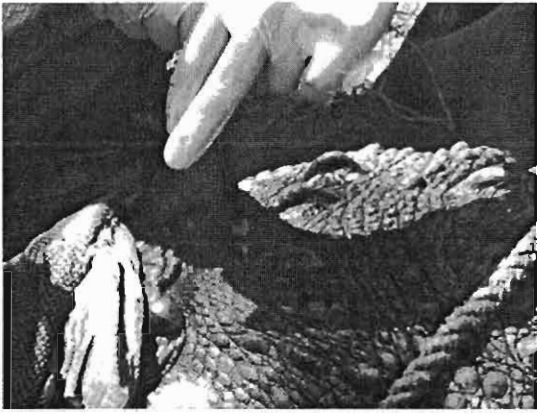


Figura 5. A) Punción sobre la línea media de la cabeza en un macho adulto. B) Colocación de soporte debajo de la cabeza. C) Punción para la extracción de sangre. D) Extracción de muestra de sangre en un animal juvenil.

Una vez obtenida la muestra de sangre, se colocó en un tubo de vidrio al vacío con EDTA, para evitar que se coagulara al inactivar los iones de calcio que son necesarios para el mecanismo normal de la coagulación (Rodríguez *et al.*, 2006).

5.4. REGISTROS BIOMÉTRICOS MORFOLÓGICOS

En los animales juveniles (menores a 1.25 m) se tomaron los datos biométricos morfológicos (Fig. 6) para completar los registros de cada individuo (Anexo 1).

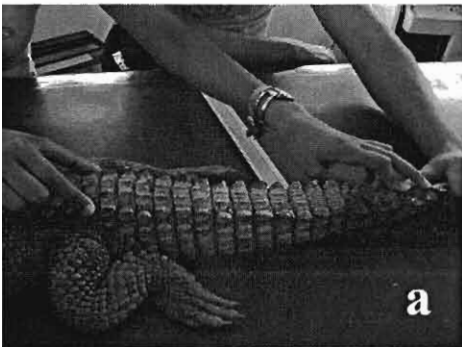




Figura 6. a) Conteo de escamas caudales. b) Conteo de escamas dorsales. c) Medición del ancho del hocico en la punta.

5.5. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de sangre empleando:

- A) Extracción y purificación de ADN de sangre con la técnica salina (Anexo 2). Protocolo previamente descrito por Sambrook *et al.* (1989), con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), y en el de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAN (modificado por Lemus, comunicación personal).
- B) Extracción y purificación de ADN de sangre (Anexo 3). Protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001), modificado en el laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X).
- C) Extracción y purificación de ADN de coágulo de sangre (Anexo 4). Protocolo previamente descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Para las extracciones realizadas en el laboratorio de Genética Molecular de la UAN, se realizó una revisión de la cantidad y calidad de la muestra, tiñendo con bromuro de etidio por medio de electroforesis de agarosa al 1%. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron de 30 min a 90 voltios. Al término de la electroforesis, los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV utilizando como marcador de peso molecular λ BstEII teñidos con

bromuro de etidio, a una concentración final de 5 µg/ml durante 5 min, considerándose como purificaciones óptimas aquellas que presentaban una banda única, intensa y de alto peso molecular.

La revisión de la cantidad y calidad de ADN de la muestra de sangre y coágulo realizadas en el laboratorio de Microbiología de la UAM-X, se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa de 0.8% a 2%. Las condiciones de electroforesis fueron 45 min a 80V. A su término, los productos se visualizaron en un fotodocumentador, utilizando un marcador de peso molecular λ DNA/*Hind* III, teñidos en bromuro de etidio.

La concentración de ADN, pureza y longitud de los fragmentos se obtuvieron por espectrofotometría en la región ultravioleta a 260 nm.

La amplificación del ADN se realizó por medio de PCR, en termociclador con los siguientes parámetros (Dever y Densmore, 2001):

- 1) Desnaturalización a 94°C por 3 min.
- 2) 30 ciclos a 94°C por 15 seg.
- 3) Anillamiento a 58-67°C por 15 seg (dependiendo de la temperatura de anillamiento de cada "primer").
- 4) Extensión a 72°C por 50 seg.

Debido a la carencia de iniciadores ("primers") específicos para *C. acutus*, se decidió utilizar 7 microsatélites desarrollados para otra especie de cocodrilos (*C. johnsoni*) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencia de "primers" 5' a 3' de *Crocodylus johnsoni*.

Locus	Primers	Temperatura de anillamiento	Tamaño (pb)
<i>Cj16</i>	F:CAT GCA GAT TGT TAT TCC TGA TG R:TGT CAT GGT GTC AAT TAA ACT C	58	132-152
<i>Cj18</i>	F:ATC CAA ATC CCA TGA ACC TGA GAG R:CCG AGT GCT TAC AAG AGG CTG G	60	190-192
<i>Cj20</i>	F:ACA ATG GGG ATC AGT GCA GAG R:GTT TCA AAT CCA CAG TCA TAT AGT CC	62	149-179
<i>Cj35</i>	F:GTT TAG AAG TCT CCA AGC CTC TCA G R:CTG GGG CAA GGA TTT AAC TCT C	58	144-165
<i>Cj109</i>	F:GTA TTG TCA ACC CCA CCG TGT C R:GTT TCC CCT CCA CAG ATT TAC TTG C	67	362-379
<i>Cj119</i>	F:GTT TGC TGT GGA ATG TTT CTA C R:CGC TAT ATG AAA CGG TGG CTG	60	175-179
<i>Cj131</i>	F:GTT TGT CTT CTT CCT CCT GTC CCT C R:AAA TGC TGA CTC CTA CGG ATG G	60	210-218

Tomados de FitzSimmons *et al.*, 2000.

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes fueron separados en función de su tamaño, primero por electroforesis en gel de agarosa 0.8-2.5% y después en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Las bandas obtenidas se tiñeron con bromuro de etidio, y su concentración fue calculada por la intensidad de la banda por medio de sistemas automatizados (Sambrook *et al.*, 1989).

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La identificación del tamaño de los fragmentos amplificados (alelos) fue a través del programa Peak Scan, una vez obtenidos se estimó la diversidad genética presente dentro de la población con los siguientes parámetros:

- a) Frecuencias alélicas
- b) Proporción de *loci* polimórficos
- c) Número medio de alelos por *locus*
- d) Número de alelos efectivos
- e) Heterocigosidad
- f) Índice de contenido polimórfico
- g) Diversidad genética
- h) Distancia estándar de Nei
- i) Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para calcular las frecuencias alélicas, número de alelos, heterocigosidad, diversidad genética, y contenido polimórfico, primero se elaboró una matriz en donde se le asignó una unidad alfabética a cada alelo presente en cada *locus*.

Los análisis estadísticos se realizaron por medio del software *Info-gen* (Balzarini *et al.* 2006), software Phylip para la elaboración de la filogenia; así como Excel para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg.

VI. RESULTADOS

El ADN de las muestras de sangre de cocodrilo obtenidas en el Laboratorio de Genética Molecular de la UAN fue visualizado en gels de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio (Figs. 7a y 7b). En el primer carril se puede observar el marcador molecular empleado (λ DNA/*Hind* III). En los carriles 3, 4, 5 de la Figura 7a, se puede visualizar el ADN, de igual manera en la Figura 7b, los carriles 3 y 4 muestran la presencia de ADN.

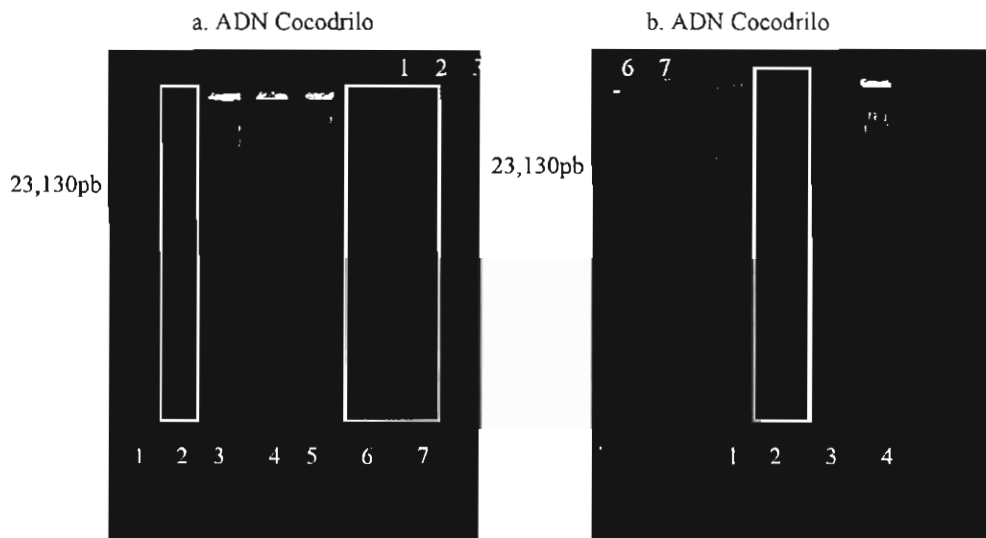


Figura 7. Visualización ADN cocodrilo

En las extracciones de ADN realizadas en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-X (Fig. 8), se pudieron visualizar las bandas provenientes de las muestras de sangre de cocodrilo (carriles 2 y 3) en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador λ DNA/*Hind* III (carril 1).

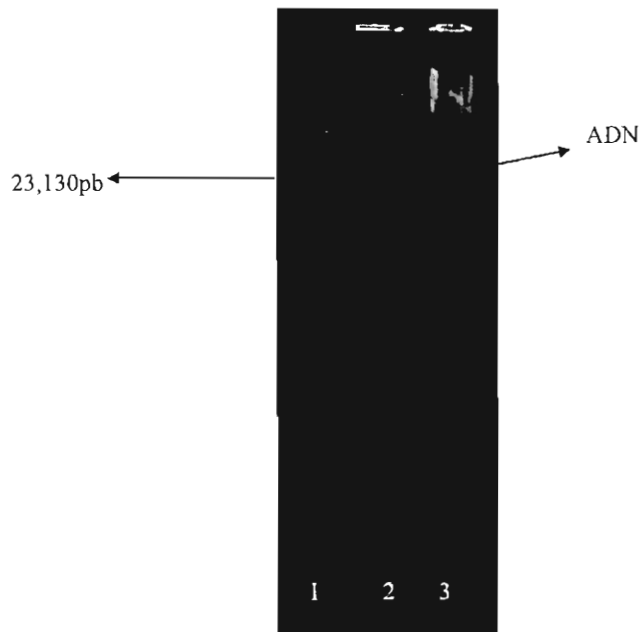


Figura 8. Visualización ADN Cocodrilo (Extracción UAM-X)

En la Fig. 9 puede observarse en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, el ADN obtenido de los coágulos de sangre de cocodrilo; en el primer carril se observa el marcador λ DNA/*Hind* III.

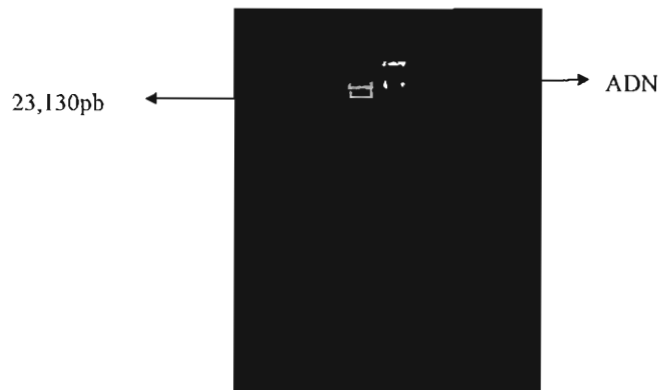


Figura 9. ADN Cocodrilo (Coágulo sanguíneo)

Por medio de un espectrofotómetro se realizó la cuantificación de las muestras de ADN de cocodrilo, tanto de las extracciones provenientes del Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad Académica de la UAN, como las realizadas en la UAM-X (Cuadro 3). Las muestras con un valor cero corresponden a las muestras que no se visualizaron en los geles.

Cuadro 3. Valores obtenidos por espectrofotometría.

Muestra	Concentración Extracción Nay $\mu\text{g/ml}$ (Sangre)	Concentración Extracción UAM $\mu\text{g/ml}$ (Sangre)	Concentración Extracción UAM $\mu\text{g/ml}$ (Coágulo)	Registro Muestra (*)
Coc1	0 (-0.51)			xxxxxx
Coc2	1.5421			Q1
Coc3	0.3451			Q2
Coc4	2.0932			Q3
Coc5	0 (-0.18)	25.80		Q4
Coc7	0 (-6.08)	29.28		Q5
Coc8	0.7304			Q6
Coc9	0.9208			Q7
Charlie			4.27	Q8
Coc6	0 (-1.31)		13.93	Q9

(*) = Los datos de cada muestra pueden observarse en el Anexo 5.

RESULTADOS PRIMER Cj16

Los productos obtenidos por PCR a una temperatura de alineación de 58°C del primer Cj16 (Fig. 10) fueron visualizados en gel de agarosa al 0.8% (a) y al 1,2% (b). En la Fig. 10a, se utilizó un marcador molecular $\lambda\text{DNA}/Hind$ III; sin embargo, aunque los productos que se observan (132-152pb) pueden distinguirse, fue necesario realizar un nuevo gel de agarosa al 1.2%

por su mayor rango de separación de fragmentos y nitidez (Fig. 10b), con un marcador molecular λ DNA/*Hind* III para 564 pb, y un marcador 123 DNA *ladder* para 123 pb.

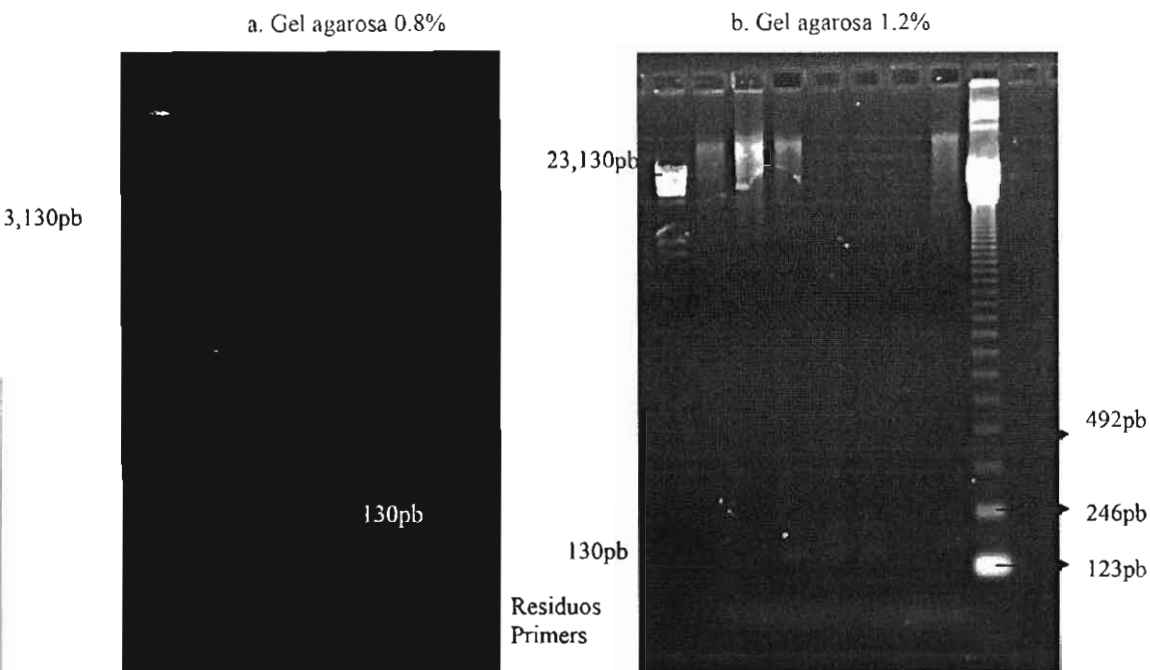


Figura 10. Amplificaciones PCR

Los geles de agarosa tienen un amplio rango de separación, pero una resolución relativamente baja; variando la concentración de agarosa, se pueden separar fragmentos de ADN de 200 a 50,000pb. En cambio los geles de poliacrilamida tienen un rango de separación bajo y un alto nivel de resolución, son usados para separar fragmentos menores a 500pb, permitiendo la visualización de fragmentos que difieran en un solo par de bases.

Debido a la falta de nitidez de los productos obtenidos en las amplificaciones de PCR, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (Fig. 11) utilizando un marcador molecular 123DNA *ladder* para 123pb, permitiendo una mejor visualización de los productos.

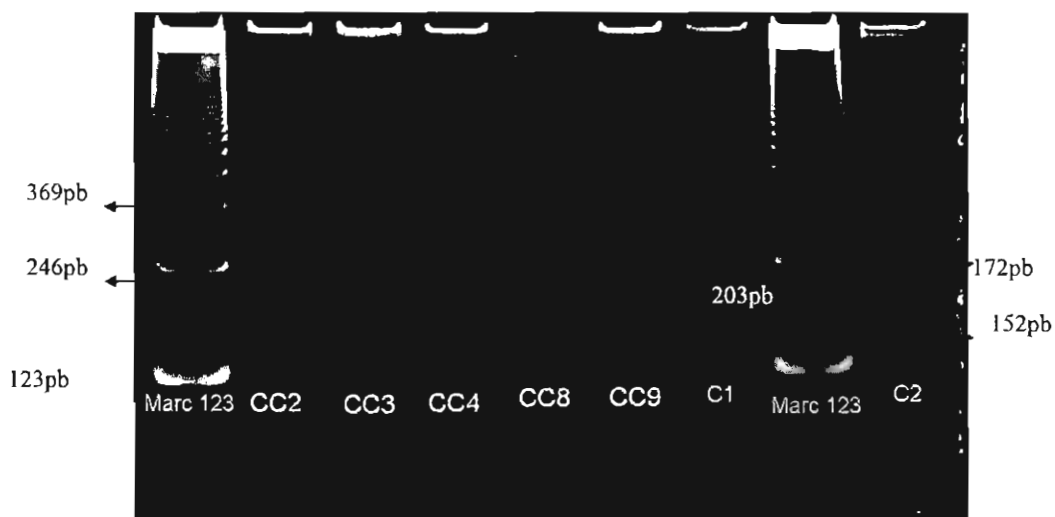


Figura 11. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj 16*

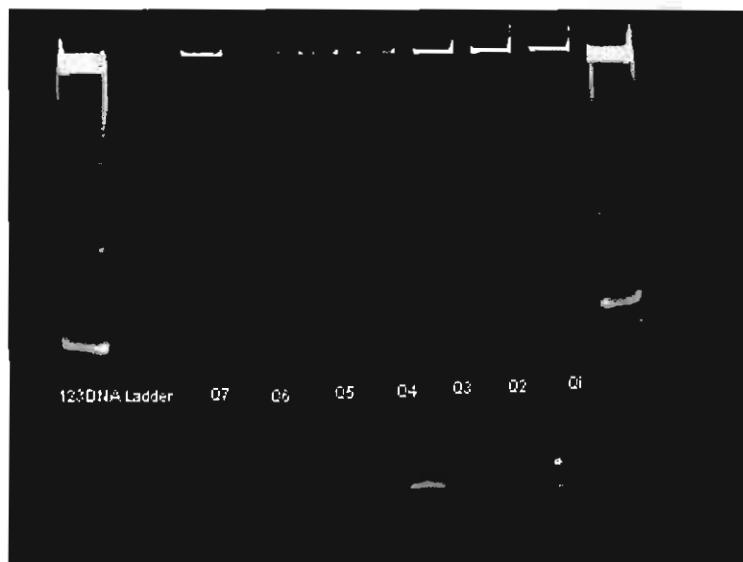


Figura 12. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj16*

En la Fig. 12 pueden observarse bandas de mayor nitidez con un peso molecular aproximado de 132-164pb, valores reportados previamente por Fitzsimmons *et al.* (2000). En las muestras Q1, Q4, Q5, también se pueden visualizar bandas de mayor tamaño (730-850pb).

De las bandas obtenidas en cada una de las muestras puede denotarse por sus características tres grupos de individuo, un primer grupo (Q2, Q3, Q6) integrado por dos bandas (109-145pb peso aproximado); el segundo grupo (Q1, Q4, Q5) con presencia de tres bandas (115-131-188pb) y un tercer grupo (Q7) con dos bandas (123-147pb).

RESULTADOS PRIMER Cj18

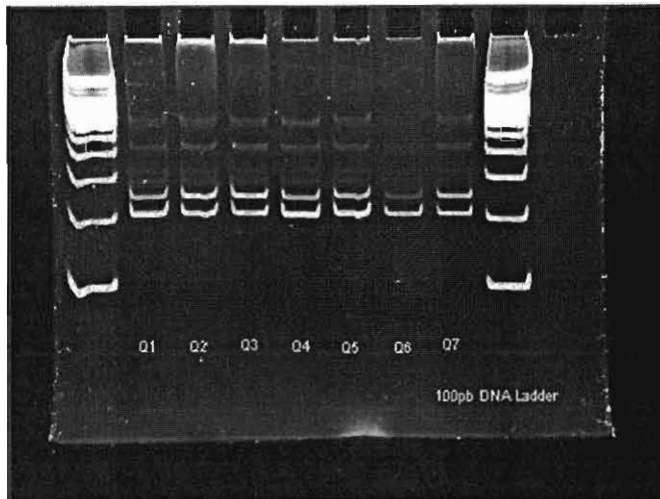


Figura 13. Gel poliacrilamida al 12% Primer Cj18

De las ampliificaciones obtenidas con una temperatura de alineación de 60°C con el Primer Cj18 (Fig. 13) en un gel de poliacrilamida al 12%, se puede visualizar un bandeo de mayor intensidad con un peso aproximado de 200-220pb en cada una de las muestras, de la misma manera que se presentan un grupo de bandas inespecíficas que van desde las 390pb a 700pb aproximadamente.

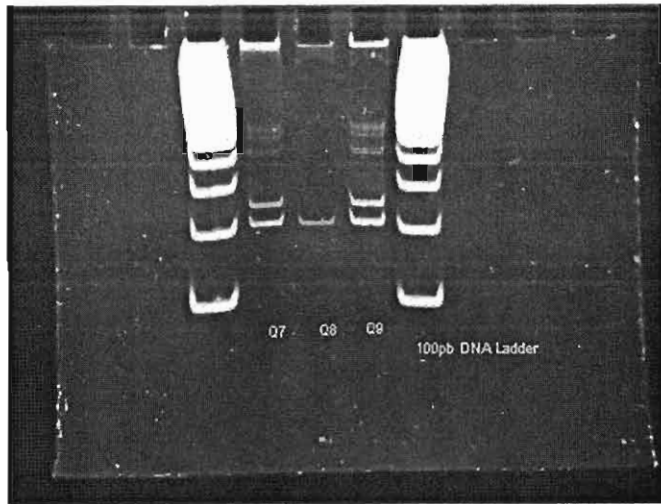


Figura 14. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj18*

En la Fig. 14, las muestras Q7 y Q9 presentan un primer bandeo de mayor intensidad, de un peso aproximado 210-250pb, así como un bandeo inespecífico con menor intensidad (430-500pb). En el caso de Q8 únicamente presenta la amplificación de una banda con un peso aproximado de 210pb.

RESULTADOS PRIMER *Cj20*

Fitzsimmons (2000) reportó la obtención de amplificaciones con el Primer *Cj20* para *C. johnsoni*, con una temperatura de alineación de 62°C; en el caso de *C. acutus* fue necesario un ajuste de temperatura a 58°C en el cual se obtuvieron bandas con una peso aproximado de 40-50pb, visualizados en un gel de poliacrilamida al 20% con un marcador de 100pb DNA Ladder y un marcador de 10pb DNA Ladder (Fig. 15).

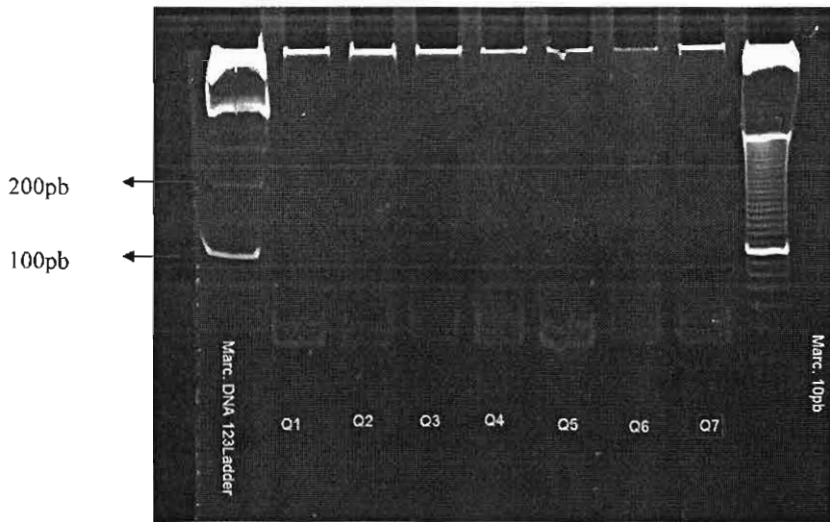


Figura 15. Gel poliacrilamida al 20% Primer *Cj* 20 con albúmina

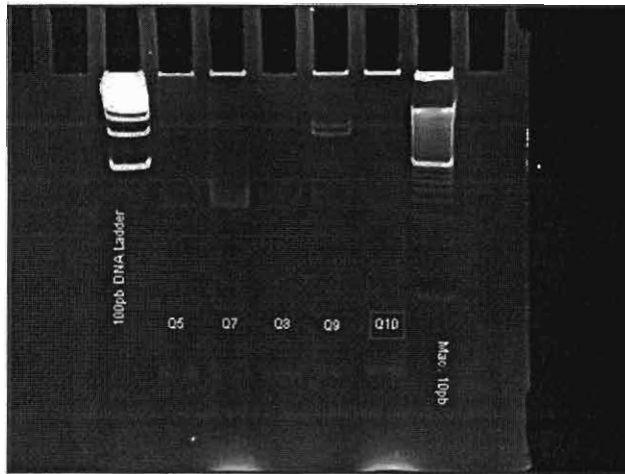
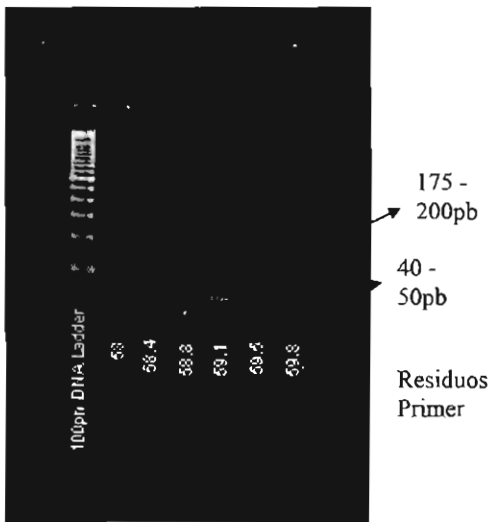


Figura 16. Gel poliacrilamida al 20% Primer *Cj*20

En la Fig. 16 puede observarse un bandeo de 40–50pb (aproximadamente) en todas las muestras. Las muestras Q9 y Q5 son las únicas que presentan bandas con un peso aproximado de 179-200pb.

Para poder confirmar los resultados obtenidos se corrió un PCR en un termociclador de gradientes con la muestra Q9, donde las amplificaciones se realizaron con una temperatura de alineación de 58° a 62°C. En la Fig. 17 (a y b) pueden observarse las amplificaciones obtenidas, en todos los casos se visualizan bandas con un peso aproximado de 175–200pb, así como bandas por debajo del marcado de 100pb DNA *Ladder*.

a) Temperatura de alineación de 58° a 59.6



b) Temperatura de alineación de 60.2° a 62°

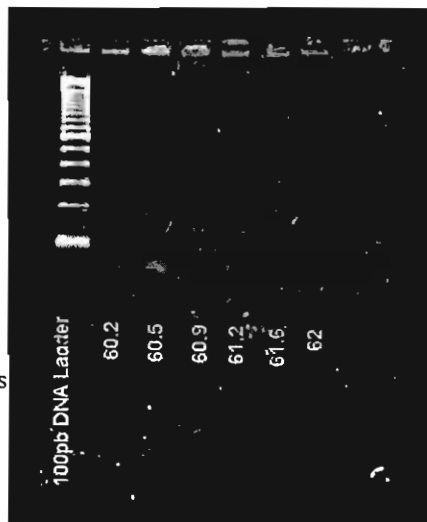


Figura 17. Gel agarosa 2.0% muestra Q9 y Primer *Cj20*

Utilizando de referencia el resultado obtenido, se corrió un nuevo PCR con todas las muestras a una temperatura de alineación de 61.6°C, temperatura a la cual las bandas (175-220pb) se visualizan con mayor nitidez.

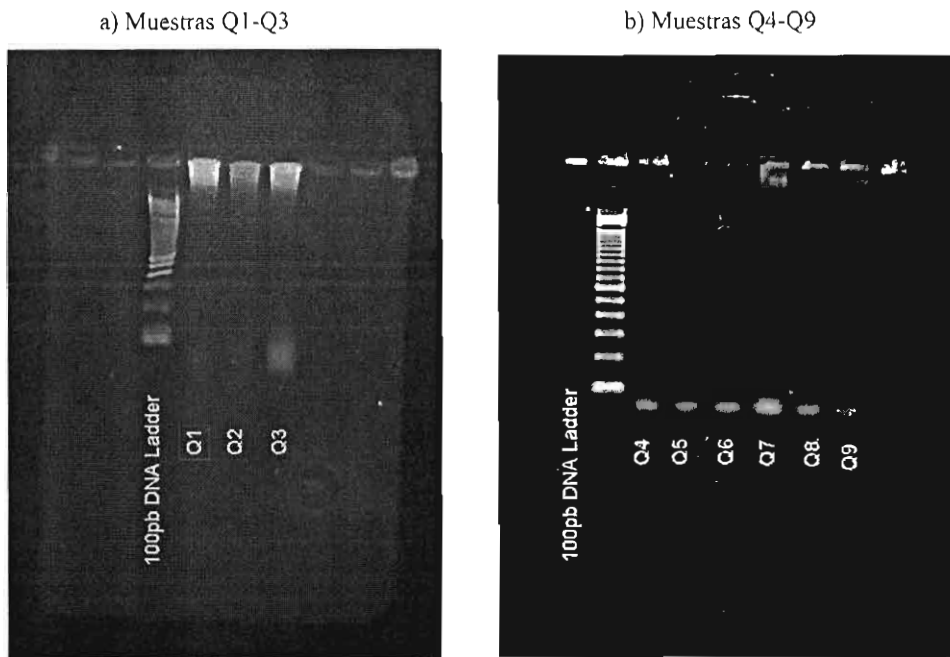


Figura 18. Gel agarosa 2.0% Primer *Cj20*

En la muestra visualizada en un gel de agarosa al 2.0% (Fig. 18a) se observan bandas por debajo del marcador molecular de 100pb DNA *Ladder*. En la Figura 18b las muestras Q4, Q5, Q8 y Q9, presentan bandas de un peso aproximado de 175-200pb al igual que una amplificación por debajo del marcador molecular.

RESULTADOS PRIMER Cj35

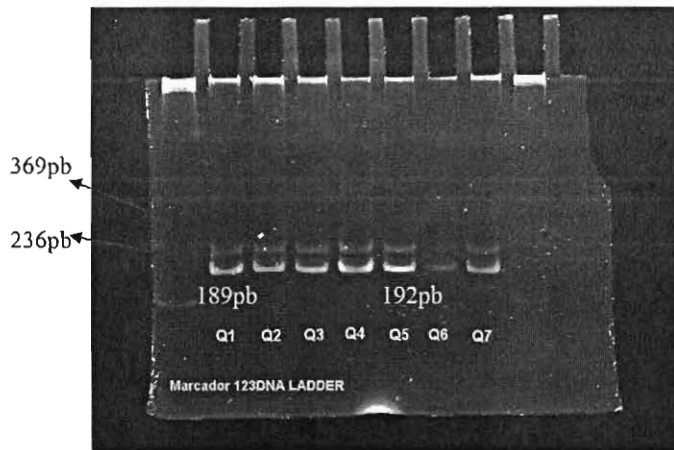


Figura 19. Gel poliacrilamida al 12% Primer Cj 35

En las amplificaciones obtenidas con una temperatura de alineación de 58°C con el primer Cj35 (Fig. 19) en un gel de poliacrilamida al 12%, se observa un bandeo de mayor intensidad con un peso aproximado de 189-236pb. Dentro de las muestras Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 y Q7, se pueden visualizar bandas inespecíficas de menor nitidez (400 y 500pb).

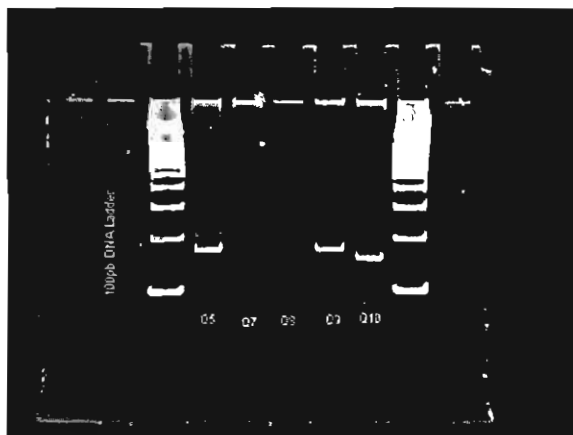


Figura 20. Gel poliacrilamida al 12% Primer Cj35

En las muestras Q5, Q9 (Fig. 20) puede observarse con mayor intensidad la presencia de dos bandas con un peso aproximado de 173-200pb, además de presentar un bandeo de mayor peso molecular (300–415pb). En el caso de Q7 y Q8 únicamente se observa una banda sencilla de 173pb (peso aproximado).

RESULTADOS PRIMER Cj109

En los productos obtenidos por PCR con una temperatura de alineación de 64°C del Primer *Cj109* (Fig. 21) se visualizan un primer grupo de banda de mayor nitidez con un peso aproximado de 310–370pb y un segundo grupo de bandas de menor intensidad de 500 a 600pb aproximadamente. Las muestras Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 y Q7 presentan un tercer grupo de bandas con un peso aproximado de 900 a 1501pb.

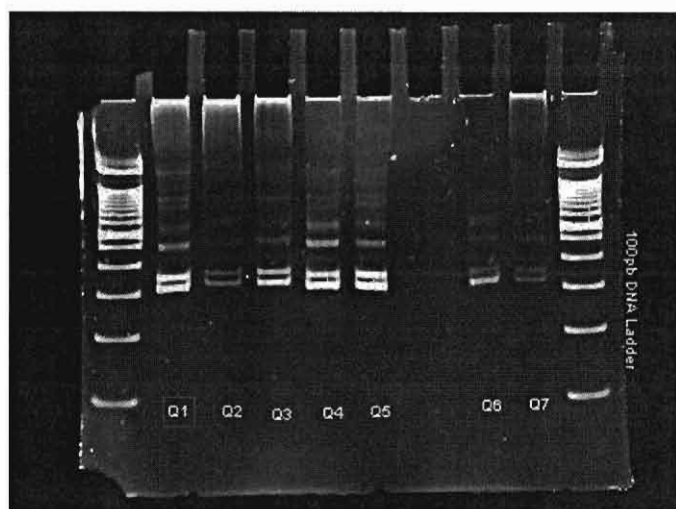


Figura 21. Gel poliacrilamida al 12% Primer Cj109

RESULTADOS PRIMER Cj119

En la Fig. 22, se observan las amplificaciones obtenidas con una temperatura de alineación de 60°C del Primer *Cj119* en un gel de poliacrilamida al 12%, utilizando un marcador molecular DNA123 *Ladder* para 123pb.

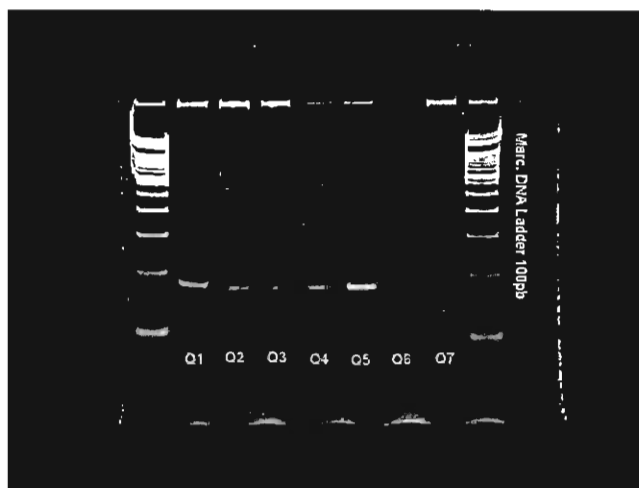


Figura 22. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj* 119

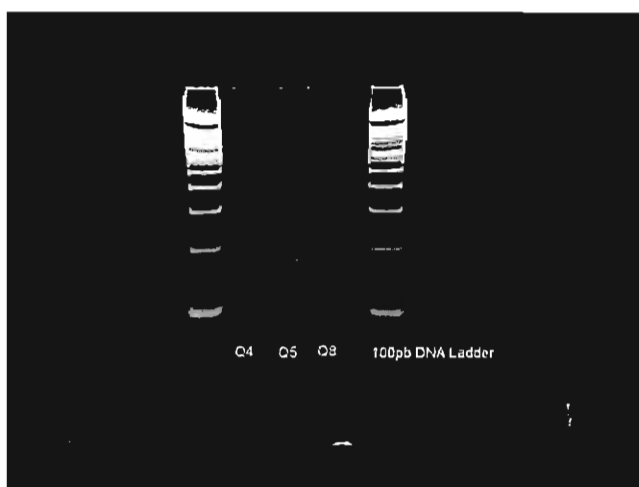


Figura 23. Gel Poliacrilamida Primer *Cj*119

En la Fig. 23 pueden observarse las bandas obtenidas con mayor nitidez con un peso aproximado de 179–210pb; en todos los casos se presenta un bandeo inespecífico de 470pb, con menor nitidez.

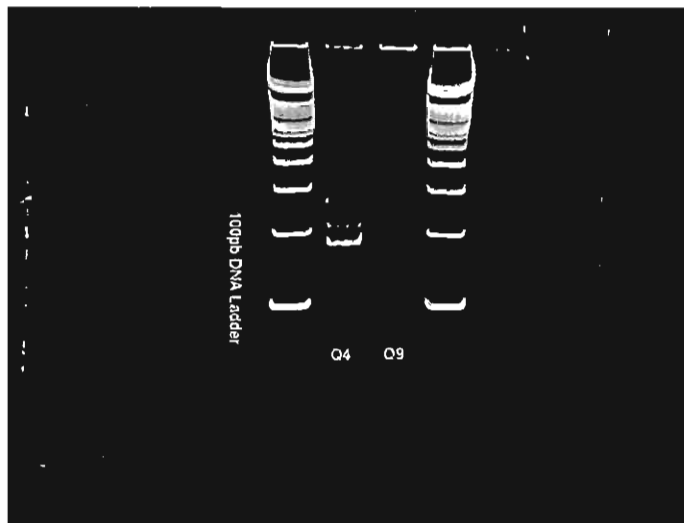


Figura 24. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj119*

De la amplificación obtenida del Primer *Cj119* (Fig. 24) se puede observar que la muestra Q4, presenta un bandeo de mayor nitidez con un peso aproximado de 166-211pb, así como un bandeo inespecífico de mayor peso molecular (349-380pb), en el caso de Q9 se visualiza una banda de mayor nitidez (175pb) seguida de una de menor intensidad (216pb).

RESULTADOS PRIMER *Cj131*

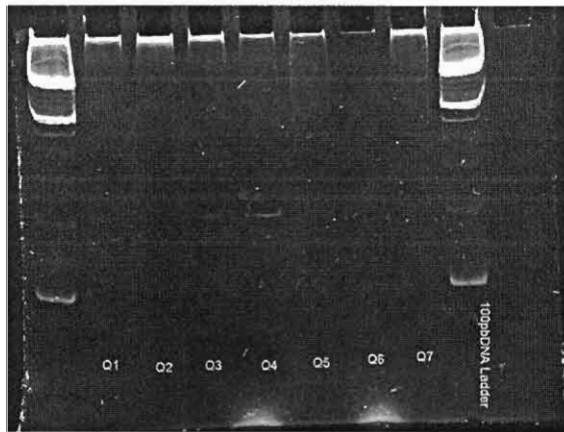


Figura 25. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj131*

De las ampliaciones obtenidas con el Primer *Cj131* con una temperatura de alineación de 60°C (Fig. 25), puede observarse en las muestras Q1, Q2, Q3, Q4 y Q7 una banda de peso aproximado de 200pb.

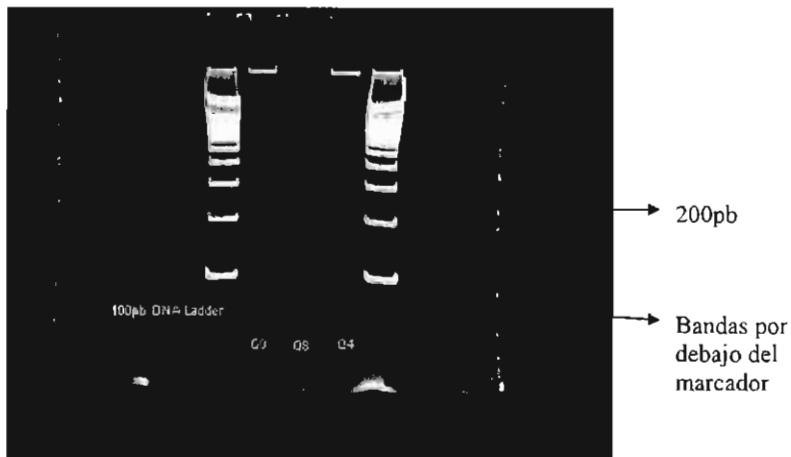


Figura 26. Gel poliacrilamida al 12% Primer *Cj131*

XOCHIRILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

Las muestras Q4 y Q9 (Fig. 26) presentan una banda de peso aproximado de 200pb, también pueden observarse bandas por debajo del marcador de 100pb DNA *Ladder*.

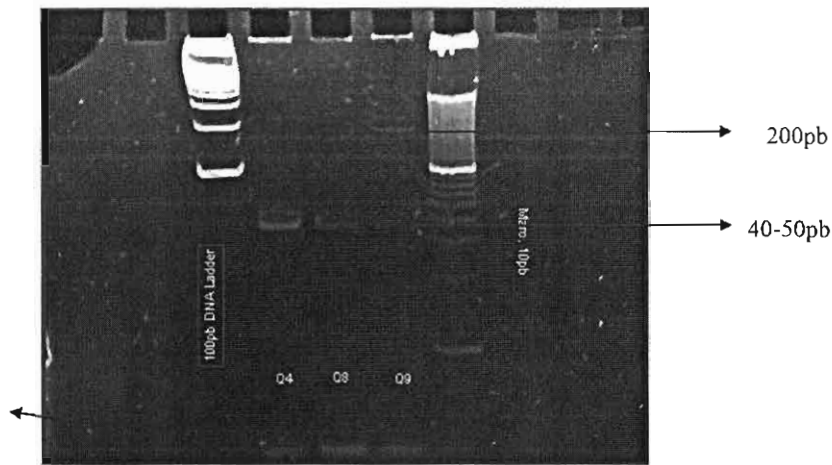


Figura 27. Gel poliacrilamida al 20% Primer *Cj131*

Se corrió un nuevo gel de poliacrilamida al 20% con los productos obtenidos de PCR de las muestras Q4, Q8 y Q9 (Fig. 27), con un marcador molecular de 100pb DNA *Ladder* y un marcador de 10pb DNA *Ladder*. En todas las muestras se observa una amplificación con un peso aproximado de 40-50pb. Las muestras Q4 y Q9 presentan un segundo grupo de bandas con un peso de 200pb, aproximadamente.

En la Fig. 28 se presenta la visualización de dos electroferogramas con los que se determinaron por medio de un secuenciador los tamaños exactos de los fragmentos obtenidos.

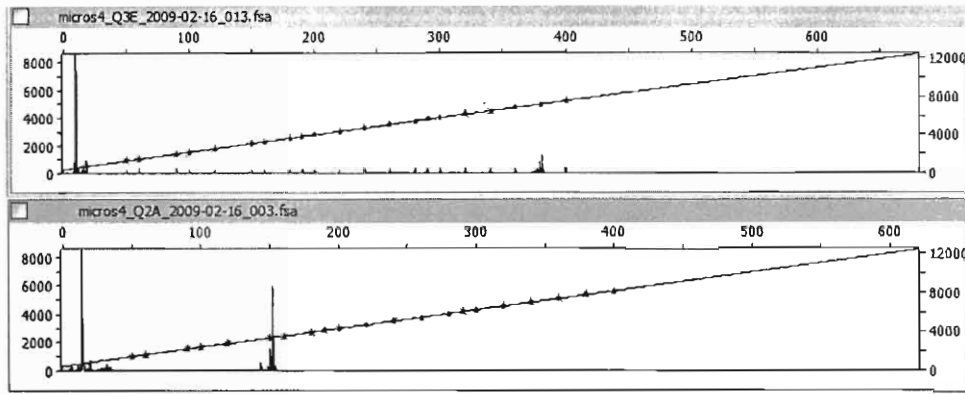


Figura 28. Electroferogramas

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En el Cuadro 4 se observan los fragmentos amplificados (alelo) de cada iniciador (*locus*) obtenido de las muestras de ADN de cocodrilo con un secuenciador y analizados por medio del programa Peak Scan. Los valores que se presentan en cero, son aquellos que no amplificaron.

Cuadro 4. Tamaño de fragmentos (alelos) por individuo y *locus* (iniciador)

Locus	Cj16	Cj18	Cj20	Cj35	Cj109	Cj119	Cj131
Individuo							
Q1	152-174	200-202	0	165-167	373-375	176-176	0
Q2	150-152	200-202	172-210	163-165	379-381	176-176	0
Q3	150-152	0	172-172	121-165	379-381	176-176	0
Q4	148-148	198-200	0	163-165	0	176-176	215-215
Q5	150-152	200-202	0	121-165	373-375	176-176	215-215
Q6	150-152	198-200	0	163-165	373-375	0	0
Q7	174-178	200-202	0	0	367-375	0	0
Q8	150-152	0	0	0	0	248-248	0
Q9	152-174	200-202	172-172	163-165	375-377	0	0

El iniciador *Cj131* fue eliminado de los cálculos estadísticos debido al bajo número de alelos monomórficos que amplificaron.

En los Cuadros 5 y 6 se presenta la matriz de asignación alfabética para cada alelo presente en cada *locus*, con el que se realizó el cálculo de las frecuencias alélicas (Cuadro 7).

Cuadro 5. Asignación de unidad alfabética a cada alelo presente en los *loci* *Cj16*, *Cj18* y *Cj20*

<i>Cj16</i>			<i>Cj18</i>			<i>Cj20</i>		
Individuo	Alelo		Individuo	Alelo		Individuo	Alelo	
Q4	148	A	Q4	198	A	Q2	172	A
Q4	148	A	Q6	198	A	Q3	172	A
Q2	150	B	Q1	200	B	Q3	172	A
Q3	150	B	Q2	200	B	Q9	172	A
Q5	150	B	Q4	200	B	Q9	172	A
Q6	150	B	Q5	200	B	Q2	210	B
Q8	150	B	Q6	200	B			
Q1	152	C	Q7	200	B			
Q2	152	C	Q9	200	B			
Q3	152	C	Q1	202	C			
Q5	152	C	Q2	202	C			
Q6	152	C						
Q8	152	C						
Q9	152	C						
Q1	174	D						
Q7	174	D						
Q9	174	D						
Q7	178	E						

Cuadro 6. Asignación unidad alfabética a cada alelo en los *loci* *Cj35*, *Cj109* y *Cj119*

<i>Cj35</i>			<i>Cj109</i>			<i>Cj119</i>		
Individuo	Alelo		Individuo	Alelo		Individuo	Alelo	
Q3	121	A	Q7	367	A	Q1	176	A
Q5	121	A	Q1	373	B	Q1	176	A
Q2	163	B	Q5	373	B	Q2	176	A

Q4	163	B	Q6	373	B	Q2	176	A
Q6	163	B	Q1	375	C	Q3	176	A
Q9	163	B	Q5	375	C	Q3	176	A
Q1	165	C	Q6	375	C	Q4	176	A
Q2	165	C	Q7	375	C	Q4	176	A
Q3	165	C	Q9	375	C	Q5	176	A
Q4	165	C	Q9	377	D	Q5	176	A
Q5	165	C	Q2	379	E	Q8	248	B
Q6	165	C	Q3	379	E	Q8	248	B
Q9	165	C	Q2	381	F			
Q1	167	D	Q3	381	F			

Cuadro 7. Frecuencias alélicas relativas por *locus* analizado.

Alelo	A	B	C	D	E	F	TOTAL
Locus							
<i>Cj16</i>	0,111	0,278	0,389	0,167	0,056	-	1,0
<i>Cj18</i>	0,143	0,500	0,357	-	-	-	1,0
<i>Cj20</i>	0,833	0,167	-	-	-	-	1,0
<i>Cj35</i>	0,143	0,286	0,500	0,071		-	1,0
<i>Cj109</i>	0,071	0,214	0,357	0,071	0,143	0,143	1,0
<i>Cj119</i>	0,833	0,167	-	-	-	-	1,0

(-) Indica ausencia del alelo respectivo.

En el Cuadro 8 se muestra la matriz de los datos genotípicos de los individuos por cada *locus*, con la cual se calcularon las frecuencias genotípicas presentes (Cuadro 9).

Cuadro 8. Matriz de datos genotípicos presentes en cada *locus* en la población

Locus	<i>Cj16</i>	<i>Cj18</i>	<i>Cj20</i>	<i>Cj35</i>	<i>Cj109</i>	<i>Cj119</i>
Individuo						
Q1	CD	BC		CD	BC	AA
Q2	BC	BC	AB	BC	EF	AA
Q3	BC		AA	AC	EF	AA
Q4	AA	AB		BC		AA
Q5	BC	BC		AC	BC	AA
Q6	BC	AB		BC	BC	

Q7	DE	BC			AC
Q8	BC				BB
Q9	CD	BC	AA	BC	CD

Cuadro 9. Frecuencias genotípicas por locus

Locus	Genotipo	Frecuencia	Locus	Genotipo	Frecuencia
<i>Cj16</i>	AA	0,111	<i>Cj18</i>	AB	0,286
	BC	0,556		BC	0,714
	CD	0,222			
	DE	0,111			
<i>Cj20</i>	AA	0,667	<i>Cj35</i>	AC	0,286
	AB	0,333		BC	0,571
				CD	0,143
<i>Cj109</i>	AC	0,143	<i>Cj119</i>	AA	0,833
	BC	0,429		BB	0,167
	CD	0,143			
	EF	0,286			

El Cuadro 10 presenta los valores obtenidos de diversidad genética, heterocigosidad (estimada y observada), índice de contenido polimórfico y alelos efectivos. Los resultados obtenidos por el Índice de fijación F se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 10. Valores obtenidos por medio del software *Info-gen*

Locus	DG	Ho	He	PIC	Ae
<i>Cj16</i>	0.728	0.889	0.771	0.684	3.682
<i>Cj18</i>	0.602	1.000	0.648	0.523	2.513
<i>Cj20</i>	0.278	0.333	0.333	0.239	1.385
<i>Cj35</i>	0.643	1.000	0.692	0.585	2.800
<i>Cj109</i>	0.776	1.000	0.835	0.744	4.455
<i>Cj119</i>	0.278	0.000	0.303	0.239	1.385
Media	0.551	0.704	0.597	0.502	2.703

DG= Diversidad genética, He= Heterocigosidad estimada, Ho= Heterocigosidad observada,
PIC= Índice de contenido polimórfico, Ae= Alelos efectivos.

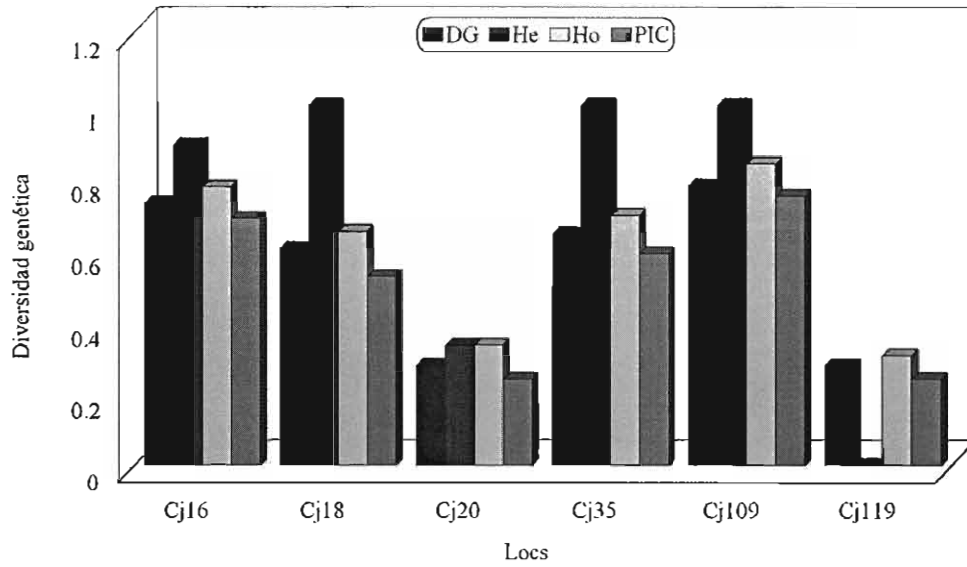


Diagrama 1. Diversidad genética, He= Heterocigosidad estimada, Ho= Heterocigosidad observada, PIC= Índice de contenido polimórfico, Ae= Alelos efectivos

Cuadro 11. Índice de fijación F

Locus	Ho	He	F
<i>Cj16</i>	0,889	0,771	-0,153
<i>Cj18</i>	1,000	0,648	-0,543
<i>Cj20</i>	0,333	0,333	0,000
<i>Cj35</i>	1,000	0,692	-0,445
<i>Cj109</i>	1,000	0,835	-0,198
<i>Cj119</i>	0,000	0,303	1,000
Media	0,704	0,597	-0,179

Cuadro 12. Distancias estándar de Nei entre individuos (0.1)

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9
Q1	0.00	0.48	0.77	0.69	0.18	0.67	0.75	2.14	0.69
Q2	0.48	0.00	0.24	0.62	0.36	0.75	1.52	1.52	0.62
Q3	0.77	0.24	0.00	0.95	0.48	1.26	-	1.52	0.77
Q4	0.69	0.62	0.95	0.00	0.69	0.90	2.14	-	1.39
Q5	0.18	0.36	0.48	0.69	0.00	0.49	1.04	1.45	0.88
Q6	0.67	0.75	1.26	0.90	0.49	0.00	1.24	1.24	0.67
Q7	0.75	1.52	-	2.14	1.04	1.24	0.00	-	0.75
Q8	2.14	1.52	1.52	-	1.45	1.24	-	0.00	2.14
Q9	0.69	0.62	0.77	1.39	0.88	0.67	0.75	2.14	0.00

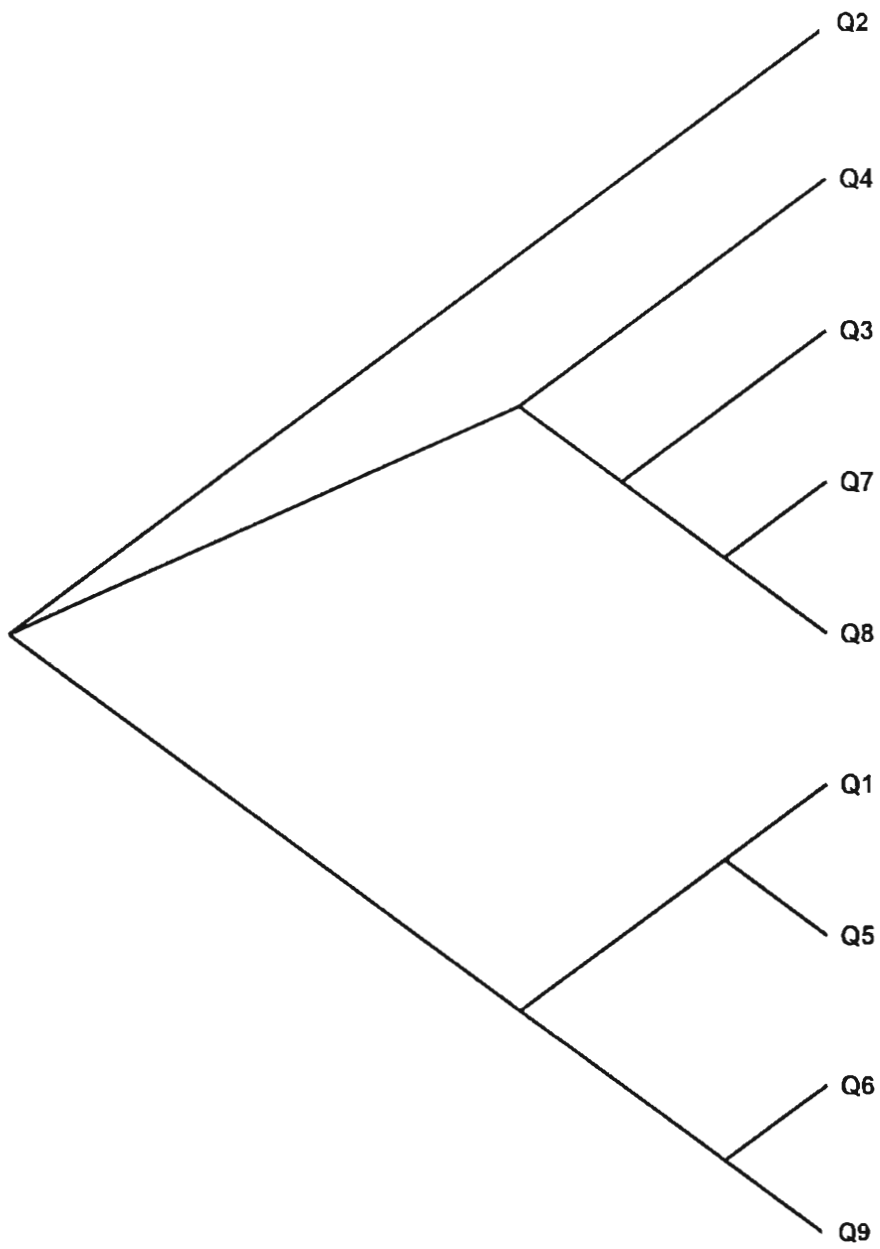


Figura 29. Árbol de distancias estandarizadas de Nei.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la variabilidad genética de una población de cocodrilo de río utilizando marcadores moleculares (microsatélites). Al no existir marcadores específicos de la especie, se emplearon microsatélites desarrollados para *C. porosus* (Fitzsimons 2000). La selección de los marcadores se determinó en un primer plano por el alto costo y tiempo que requiere desarrollarlos; un segundo criterio fue con base a estudios previos en los que se comprobó su funcionalidad en diversas especies de cocodrilos (*C. niloticus*, *C. moreletii*, *C. simmesis* y *Osteolaemus*) (Dever y Densmore 2001; Dever *et al.*, 2002).

Los siete iniciadores utilizados en esta investigación fueron amplificados exitosamente, concordando con los reportados en otro estudio en cocodrilo de río (*C. acutus*) (Rodríguez, 2007); cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) (Dever y Densmore, 2001; Dever *et al.*, 2002) y cocodrilo de agua salda (*C. porosus*) (Isberg *et al.*, 2004).

Pese a esto, el *locus* *Cj131* fue descartado del análisis estadístico debido al monomorfismo que presentó, considerándose a todos los individuos homocigóticos para ese *locus*, resultado que contrasta con los obtenidos por Dever y Densmore (2001), en cuyo estudio en el cocodrilo de pantano, el iniciador *Cj131* fue funcional para *C. moreletii*, así como para cuatro representantes del género, concluyendo que podría ser un marcador que denotara el género *Crocodylus*.

En los seis *locus* restantes se calculó el número de variantes alélicas, observándose que *Cj109* es el que presentó un mayor número de frecuencias alélicas, seguido de *Cj16*, *Cj35* y *Cj18*, respectivamente; en el caso de *Cj119* y *Cj20* resultaron las dos frecuencias más bajas. Al comparar estos resultados con las frecuencias genotípicas obtenidas, puede observarse cómo *Cj109* es el *locus* que presenta mayor número de frecuencias heterocigóticas, mientras *Cj119* es el *locus* con menor frecuencia y que en su caso son genotipos homocigóticos; por ende *Cj109* es el *locus* que presenta mayor diversidad genética ($D=0.776$) y *Cj119*, la menor diversidad ($D=0.278$).

En este estudio *Cj109* y *Cj16* fueron los *locus* más informativos al presentar un índice de contenido polimórfico alto (PIC= 0.744 y PIC=0.684, respectivamente). En el caso de *Cj20* y *Cj119*, es importante remarcar que aún cuando los valores obtenidos son semejantes, *Cj20* (3)

cuenta con un número menor de amplificaciones al contrario de *Cj119* (6). Con esto podemos concluir que el *locus Cj119* es el menos informativo con el PIC más bajo (0.239) y el que presenta una mayor homocigosidad.

El promedio de alelos efectivos en la población fue 2.703, siendo *Cj109* y *Cj16* los que presentaron los valores más altos.

Los seis *locus* analizados revelaron un nivel alto de heterocigosidad ($H_o=0.704/H_e=0.597$) en comparación con tres de seis de las poblaciones analizadas por Rodríguez (2007), al igual que los obtenidos por Dever y Densmore (2001), y Dever *et al.* (2002) en *C. moreletii* y Glen *et al.* (1998) en lagarto americano (*A. mississippiensis*).

Esta relativa alta heterocigosidad presente en nuestra población, confirma la hipótesis planteada en el estudio, considerando que los individuos muestreados conforman una población "joven" en términos estrictos de su definición. Sin embargo, nuestra población presentó valores equivalentes ($H_o=0.59/H_e=0.579$) a los de Isberg *et al.* (2004) y menores a los reportados por Davis *et al.* (2001) ($H=0.64$) en seis poblaciones de *A. mississippiensis*; al igual que en su subsecuente estudio en 12 poblaciones (Davis *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que pese a la alta heterocigosidad, es una especie que sigue sufriendo los efectos del "cuello de botella", experimentando eventos de selección en grandes magnitudes, al grado que eliminaron gran parte de la variación del genoma del cocodrilo debido a la fragmentación del hábitat y reducción de las poblaciones (Glenn *et al.*, 1998). Más aún, los análisis utilizados con ADN mitocondrial e isoenzimas en la familia *Crocodylidae*, sugieren que existen niveles bajos de divergencia genética entre las especies (Densmore, 1983; Densmore y Owen, 1989; Densmore y White, 1991).

De ahí que el efecto del "cuello de botella" sigue siendo un efecto presente que se manifiesta con una aceleración de la deriva génica, dando como resultado la fijación de alelos más frecuentes y consecuentemente una baja en las frecuencias genotípicas, y en algunos casos dando como resultados frecuencias genotípicas homocigotas, como es el caso del *Cj119* (Cuadro 9).

El uso de microsatélites en el cocodrilo de río fue efectivo debido a la alta proporción de polimorfismo que presentaron en este estudio (*loci* polimórficos (95) = 1); de igual manera el índice de contenido polimórfico se presentó en mayor proporción en los *locus Cj119*, *Cj16*, *Cj35* y *Cj18*. No obstante, Isberg *et al.* (2004) al evaluar la funcionalidad de los marcadores desarrollados por Fitzsimmons (2000) como herramienta de ayuda en la selección de cocodrilos

de agua salada (*C. porosus*) para la confirmación de pedigrí de los animales, *Cj35* aún cuando pudieron amplificarse, fue eliminado al ser no ser considerado lo suficientemente polimórfico para poder determinar el parentesco.

Cinco de los seis *locus* analizados presentaron una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con un exceso de heterocigosis, *Cj20* fue el único en equilibrio de H-W; sin embargo, esto puede deberse al bajo número de alelos obtenidos, no obstante los resultados obtenidos por medio del índice de fijación *F* confirman que los individuos forman una población que puede ser tomada como primera generación con gran diversidad genética.

Al observar las distancias genéticas de la población podemos agrupar a los individuos en tres clados (ramas) principales; una primer rama donde se ubica un individuo proveniente del estado de Nayarit. En un segundo clado, el grupo más grande conformado por individuos que provienen de dos estados distintos (Platanitos, Nayarit y Manzanilla, Jalisco), este grupo evidencia la capacidad que tienen los cocodrilos de movilizarse a grandes distancias (150 Km aprox.), movimiento que permitiría sugerir que la variabilidad de la especie se mantiene pese a la fragmentación del hábitat, las acciones del hombre y la selección. Finalmente, la última rama está constituida por dos clados que contienen un grupo de individuos provenientes de la misma región (Bahía Banderas, Jal.).

VIII. CONCLUSIONES

El uso de marcadores moleculares diseñados para *C. porosus* para determinar la diversidad genética en *C. acutus* resultó una técnica efectiva en el presente estudio.

El mejor iniciador para determinar la variabilidad genética en *C. acutus* fue el Cj109, con un índice de $D = 0.776$, superando a los demás iniciadores empleados.

La población de *C. acutus* del Centro Universitario de la Costa, Cipactli, presentó una alta heterocigosidad genética, determinando que los individuos pudieran pertenecer a distintas poblaciones, ayudando a mantener el pool genético en la especie.

La población estudiada, mostró una alta diversidad genética al presentar una desviación en el Equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto resulta favorable para el Centro, pues permitirá crear un pie de cría en la zona.

A través de las distancias génicas, se pudo dividir a la población estudiada en 4 grupos genéticos.

Finalmente, es recomendable realizar otros estudios con microsatélites, incrementando el tamaño de muestra y tomando en consideración las variables morfo-métricas de los individuos.

IX. LITERATURA CITADA

- Abadía, G. 2002. Redituabilidad ecoturística de los cocodrilos del grande de Tárcoles. *Ambientales* 24: 34-43.
- Allen, P. J., Ainos, W., Pomeroy, P. P., Twiss, S. D. 1995. Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecol.* 4: 653-662.
- Álvarez, M. 2001. Los Crocodylia en México (estudio comparativo). Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A.C. Nueva edición. México: 1-18.
- Anónimo, disponible en: http://docencia.udea.edu.co/cen/mecanismos-evolucion/origen_var2.html. 13 Marzo 2007
- Anónimo, disponible en: http://eureka.ya.com/jaleo/analisis_microsatelites5.htm. 26 octubre 2006
- Aranguren-Méndez, J. y Jordana, J. 2001. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. *Prod. Anim.* 15(2): 54-60.
- Aranguren-Méndez, J., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Prod. Anim.* 13(1): 30-42.
- Arranz, J. J. 1994. Estudio genético en poblaciones bovinas mediante polimorfismos bioquímicos y de DNA (Variaciones puntuales y microsatélites). *Tesis Doctoral*. Universidad de León.
- Artollo, D. 2004. *Manejo de Cocodrilo de Pantano (Crocodylus moreletii) en San Crisanto, Yucatán, México*. Servicio Social Lic. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.
- Balzarini, M., Artollo, A., Bruno, C., Di Rienzo, J. 2006. *Análisis de datos de marcadores con Info-Gen*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Argentina.
- Benitos, V.R. 1988. *Manual de Técnicas para la Captura y el Manejo de Cocodrilianos Silvestres y en Cautiverio*. Tesis de Lic. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México.

- Berumen, C.J., Casas, A.L., Hernández, M.A., Segura, S.E., Medina, L.R., Larriva, S.J. 1994. Diversidad genética de tres sondas en la huella digital de DNA de una población mexicana. *Rev. Invest. Clin.* 40: 457-464.
- Botstein, D., White, R. L., Skolmick, H., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Gen.* 32: 314-331.
- Bowcock, A., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R., Cavalli-Sforza L. 1994. High resolution of human evolutionary history trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457
- Brochu A. 2001. Crocodylian snouts in space and time: phylogenetic approaches toward adaptive radiation. *Amer. Zool.* 41: 564-585.
- Brochu, C. 2000. Phylogenetic relationships and divergence timing of *Crocodylus* based on morphology and the fossil record. *Copeia*, 3: 657-673.
- Brochu, C. 2003. Phylogenetic approaches toward Crocodylian history. *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* 31:357-397.
- Camarillo J., Gutiérrez E., Camarena G. 1991. Áreas naturales protegidas en México: una síntesis. *Ciencia y Desarrollo.* 17(99):39-46
- Casas A. 1992. Status y distribución del *Crocodylus acutus* en la Costa de Jalisco, México. *Anales del instituto Nacional de Biología UNAM. Serie Zoología.* 63(1): 25.
- Castillo, F.A. 1997. Observations on two american crocodile populations in Colima state, Mexico, with possible mangemen implications, En Memorias de la IV Reunión Regional del Grupo de Especialistas en Cocodrilos de América Latina y el Caribe. Villahermosa, Tabasco, México. p59.
- Cedeño, J.R. 1995. *Distribución y Situación actual de Crocodylus acutus Cuvier (1807) (reptilia Crocodylidae)*, en la costa de Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. p 58.
- Chakraborty, R. and L. Jin. 1993. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness an population distance. En: Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplenj, J.T., Jeffreys, A.J. (eds). *DNA finger-printing: state and the science*. Switzerland: BirkhäuserVerlag, Basel. pp. 153-175.

- Chung-Fai, F., Wong, K., Wnag, J., Pui-Hay, P., Shaw, P. 2002. Generation of a sequence characterized amplified region probe for authentication of crocodylian species. *Journal of experimental zoology (Mol Dev Evol)*. 294: 382-386
- Cifuentes, J. L. y Cupul, F. G. 2004. *¿Los Terribles Cocodrilos?* México: Fondo de Cultura Económica, SEP, CONACYT. 136 pp.
- Claos, G. Marcadores moleculares. 2006: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen, disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>. 29 Octubre.
- Contreras-Díaz, H.G., López, H., Oromí, P., Juan, C. 2007. Caracterización de microsatélites en especies amenazadas de insectos endémicos de canarias. Disponible en: <http://nevada.ual.es/agr-176/pdfs/GCN05.pdf>. 15 Enero
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestre (CITES), Apéndices que amparan según el grado de protección que necesiten; disponible en : <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>
- Crocodylian Species List, 2006. Disponible en: http://www.flmnh.ufl.edu/natsci/herpetology/brittoncrocs/csp_cacu.htm#imag, 25 Octubre 2006.
- Davis, L., Glenn, T., Strickland, D., Guillette, L., Elsey, R., Rhodes, W., Dessauer, H., Sawyer, R. 2002. Microsatellite DNA analyses support an East-West phylogeographic split of American alligator populations. *J. Exp. Zool. (Mol Dev Evol)* 294: 352-372.
- Densmore, L.D. 1983. Biochemical and immunological systematics of the order *Crocodylia*. En: M.K. Hecht, B. Wallace and G.T. Prance (Eds.). *Evol. Biol.* 15. USA: Plenum. pp. 397-465.
- Densmore, L.D and Owen, R. 1989. Molecular systematics of the order *Crocodylia*. *Am. Zool.* 29:831-841.
- Densmore, L.D and White, P. 1991. The systematics and evolution of the *Crocodylia* as suggested by restriction endonuclease analysis of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA. *Copeia* 1991:602-615.
- Dessauer, H., Glenn, T., Densmore, L. 2002. Studies on the molecular evolution of the crocodylia: footprints in sands of time. *J. Exp. Zool. (Mol Dev Evol)* 294: 302-311.

- Dever, J. and Densmore, L. 2001. Microsatellites in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) and their utility in addressing crocodylian population genetics questions. *J. Herpetol.* 35 (3): 541-544.
- Dever, J., Richard, E., Strauss, T., Rainwater, S., Mcmurry, Densmore, L. 2002. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia*, 4: 1078-1091.
- Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S. E., Shin, H., Friedman, J. 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*. 131: 423-447.
- Dirzo, R. and Raven, P. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Ann Rev. Energy*. 28: 138-167.
- Dodgson, J., Cheng, H. Okimoto, R. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Sci.* 76: 1108-1114.
- Domínguez, L.J. 2002. *Análisis poblacional de Crocodylus acutus (Cuvier, 1807) y Crocodylus moreletii (Duméril, 1851) en el sistema lagunar norte de la reserva de la biósfera Sian Ka'an, Quintana Roo, México.* Servicio Social Lic. Biología. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México.
- Enciclopedia de los Municipios de México, Estado de Jalisco, Puerto Vallarta. Disponible en: <http://www.jalisco.gob.mx/srias/sgg/ceem/Monografias/ptoVallarta3.html>. 10 Junio 2007
- Escobedo, A. 2004. Avances en el conocimiento y el estado actual de conservación del cocodrilo de Tumbes (*Crocodylus acutus* Cuvier, 1807) *Rev. Peru. Biol.* 11(2): 203-208.
- Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J. M. 1994. Precise assesment of the number of matings and of relatedness in honey bee colonies. *Proc. Royal Society of London Biological Sci.* 258: 1-7.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.). Populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 140: 679-695.
- Fitzsimmons, N., Tanksley, S., Forstner. 2000. Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. *Proc. Conference on Crocodylian Biology and Evolution*. G. Grigg and F. Seebacher (eds.). Australia: Surrey Beatty & Sons. pp. 51-57.

- Forbes, S. H., Hogg, J. T., Buchanan, F. C., Crawford, A. M., Alleudorf, F. W. 1995. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep *Molecular Biol. Ecol.* 12: 1106-1113.
- Fries, R., Eggen, A., Strazinger, G. 1990. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics.* 8: 403-406.
- Garner, A., Rachlow, J., Hicks, J. 2005. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conserv. Biol.* 19: 1215-1221.
- Gatersy J., De Salle R., Wheeler W. 1993. Alignment-ambiguous nucleotide sites and the exclusion of systematic data. *Mol. Phyl. Evol.* 2:152-157.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Paquino, A. T., Sargeant, L. S., Sorensen, A., Steele, M. R., Zhao, X., Womack, J. E., Hoeschele, I. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics.* 139: 907-920.
- Glenn, T.C., Stephan, W., Dessauer, H.D., Braun, M. J. 1996. Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol. Biol. Evol.* 294: 312-324.
- Glenn, T. C., Dessauer, M., Braun, M. J. 1998. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. *Copeia:* (3):591-602.
- Glenn, T., Staton, J., Vu, A., Davis, L., Alvarado, J., Rhodes, W., Brisbin, L., Sawyer, R. 2002. Low mitochondrial DNA variation among American alligator and a novel non-coding region in Crocodylians. *J. Exper. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 294:302-311.
- González A. y Cavazos H. Clasificación de Fauna (Reptiles), disponible en: <http://fmvz.uat.edu.mx/fauna/archivos/doc9.htm>. 20 Octubre 2006
- Gómez, O. M.R. 1998. *Diversidad Genética de los Loci Microsatélites y Minisatélites, Utilizados en la Identificación de Individuos, en la Población Mexicana.* Tesis de Maestría. Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México.
- Gotelli, D., Sillero-Zubiri, C., Applebaum, G. D., Roy, M. S., Girman, D. J., García-Moreno, J., Ostrand, E. A., Wayne, R. K. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Mol. Ecol.* 3: 301-312.

- Hamada, H., Seidman, M., Howard, B. H., Gordman, C. M. 1982. A novel repeat element with z-DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. National Academy Sci. USA.* 79: 6465-6469.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía (INEGI), disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx>. 20 de diciembre del 2006
- Isberg, S., Chen, Y., Baker, S., Moran, C. 2004. Analysis of microsatellites and parentage testing in saltwater crocodiles. *J. Heredity* 95:445-449.
- Jacobson, E. 2007. Infectious diseases and pathology of reptiles, color atlas and text. EUA: CRC Press. p 2
- Janke, A., y Arnason, U. 1997. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent archosauria (Birds and crocodiles). *Mol. Biol. Evol.* 14(12): 1266-1272
- Janke, A., Gulleberg, A., Hughes, S. 2005. Mitogenomic analyses place the gharial (*Gavialis gangeticus*) on crocodile tree and provide pre-K/T divergence times for most crocodylians. *J Mol Evol.* 61: 620-626
- Klung, W., Cummings, M.; Spencer, C. 2006. *Concepts of Genetics.* 8a ed. USA: Pearson Education, Inc. pp 123-130
- Kushlan, J. A. 1988. Conservation and management of the American Crocodile. *Environ. Managmt.* 12: 777-790.
- Lade, J. A., Murray, N. D., Marks, C. A., Robinson, N. A. 1996. Microsatellite differentiation between Phillip island and mainland Australian populations of the red fox *Vulpes vulpes*. *Mol. Ecol.* 5: 81-87.
- León, O., Bagazuma, F., Arredondo, P. 1997. Evaluación poblacional y algunos aspectos ecológicos de *Crocodylus acutus* en la laguna de Chiricahueto. Memorias de las 4^a Reunión Regional del Grupo de Especialistas de Cocodrilos de América Latina y el Caribe. Centro Regional de Innovación Agroindustrial, S.C. Villahermosa, Tabasco: 90-104.
- Litt, M. and Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Human Gen.* 44: 397-401.

- Machugh, D. E., Loftus, R. T., Bradley, D. G., Sharp, P. M., Cunningham, P. 1994. Microsatellites DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. Royal Soc. London Biol. Sci.* 256: 25-31.
- Martin, S. 2008. Global diversity of crocodiles (Crocodylia, reptilian) in freshwater. *Hydrobiologia.* 595: 587-591
- Messel, H., Vorlicek, J.C., Wells A.G., Green, W.J. 1981. *Surveys of Tidal River systems in the Northern Territory of Australia and their Crocodile Populations.* Monograph No. 1. Australia: Pergamon Press.
- Mindell, D., Knight, A., Baer, C., Huddleston, C. 1996. Slow rates of molecular evolution in birds and the metabolic rate and body temperature hypotheses. *Mol Biol Evol* 13: 422-426.
- Moazami-Goudarzi, K., Laloe, D., Furet, J. P., Grosclaude, F. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Gen.* 28: 338-345.
- Moazami-Goudarzi, K., Vaiman, D., Mercier, D., Grohs, C., Furet, J. P., Leveziel, H., Martin, P. 1994. Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers resultants. *Gen. Sel. Evol.* 26: 155-165.
- Navarro, M P. 1999. Distribución, abundancia y caracterización de hábitat del cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*) en la costa centro-sur de Michoacán. En Memorias de la Reunión Nacional para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Cocodrilianos en México. 22-24 de septiembre de 1999. México D.F.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, publicada el 6 de marzo de 2002 en el Diario Oficial de la Federación, disponible en: <http://www.profepa.gob.mx/NR/rdonlyres/84142613-CF26-4223-B7E9-38BE4AEB0C96/1426/NOMECOL0592001.pdf>
- Núñez, I, González, E., Barahona, A. 2003. La biodiversidad: historia y contexto de un concepto. *Interciencia.* (28)7: 387-393

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), disponible en: http://www.fao.org/index_ES.htm
- Paetkau, D. and Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecol.* 3: 489-495.
- Picca, A., Helguera, M., Salomón, N., Carrera, A. 2002. Capítulo 4. Marcadores genéticos. En: Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. pp 61-68.
- Platt, S. and Thorbjarnarson, J. 2000a. Status and conservation of Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*, in Northern Belize. *Biol. Cons.* 96: 21-29.
- Platt, S. and Thorbjarnarson, J. 2000b. Status and conservation of the American crocodile, *Crocodylus acutus*, in Belize. *Biol. Cons.* 96: 13-20.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., Schmoll, F., Horst, P., Schellander, K. 1999. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in Chicken. *J. Hered.* 90: 656-659.
- Ray, D.A., Dever, J.A., Platt, S.G., Rainwater, T. R., Finger, A.G., McMurry, S.T., Batzer, M.A., Barr, B., Stafford, P. J., McKnight, J., Densmore L. 2004. Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conserv. Gen.* 5: 449-462.
- Remolina, S., F. 1990. *Evaluación de las Poblaciones de Lagarto, Cocodrilo de Pantano Crocodylus moreletii en la Zona del Delta del Grijalba-Usumacinta*. Cocodrilos de Sinaloa S.A. de C.V. México.
- Rochambeau, H., Fournet-Hanocq, F., Vu Tien Khang, J. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 49: 77-93.
- Rodríguez, G., Hernández, H., Lemus, C. 2006. Procedimientos para el análisis del ADN. *Memorias Genética Molecular y Reproducción en Cerdos*. México: UAN/UAM-X.
- Rodríguez, D. 2007. Crocodylian evolution, systematics and population genetics recovery and ecological interactions of the american crocodile (*Crocodylus acutus*). *Tesis Doctoral*. Texas Tech University
- Ross, C. A. and Ross, FD. 1974. Caudal scalation of Central American crocodylus. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 87: 231-234.

- Ross, F.D. and Mayer, G.C. 1983 On the dorsal armor of the Crocodylia. En: *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology*. A.G.J. Rhodin y K. Miyata (Eds.). Museum Comp. Zool., Cambridge. pp. 305-331.
- Roy, M. S., Geffen, E., Smith, D., Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 1994. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.* 11: 553-570.
- Russello, M., Brazaitis, P., Gratten, J., Watkins, G., Caccone, A. 2006. Molecular assessment of the genetic integrity, distinctiveness and phylogeographic context of the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) on Palau. *Conserv. Gene.* 8: 777-787.
- Ryberg, W., Fitzgerald, L., Cathey, J. 2002. Genetic relationships of American alligator populations distributed across different ecological and geographic scales. *J. Exp. Zool. (Mol Dev Evol)* 294:325-333.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press Ed. p 1023
- SEMARNAP. 1999. Proyecto Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los *Crocodylia* en México. México: SAGARPA.
- Sanger, F., Air, B., Barrell, N., Brown, A., Coulson, J., Fiddes, C., Hutchinson III, P., Slocombe, M. Smith, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 265:687-695. En: Klung, W., Cummings, M.; Spencer, C. 2006. *Concepts of Genetics*. 8aEd. USA: Pearson Education, Inc. pp 123-130
- Sigler, L. 1995. Manipuleo de cocodrilianos en México en énfasis al estado de Chiapas. En memorias: XII Simposio Sobre Fauna Silvestre. "Gral. MV. Manuel Cabrera Valtierra". UNAM. México.
- Solbrig, O. 1994. Biodiversiy: an introduction. En Solbrig, O. *Biodiversity and Global Changes*. USA; CAB International. Walling ford, p.13
- Stallings, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., Moyzis, R. K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*. 10: 807-815.
- Talpin, L. 1984. Evolution and zoogeography of crocodylians: a new look at an ancient order. *Vertebrate evolution and zoogeography in Australasia*. Hesperian Press, Perth.361-370

- Tautz, D. and Renz, M. 1984. Simple sequences repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res.* 12: 4127-4138.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.* 17: 6463-6471.
- Taylor, A. C., Sherwin, W. B., Wayne, R. K. 1994. Genetic variation of microsatellites loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Mol. Ecol.* 3: 277-290.
- Thorbjarnarson, J. 1989. Ecology of the American crocodile, *Crocodylus acutus*. En: *Crocodiles, their Ecology, Management and Conservation*. IUCN Publ. News Series, Gland. pp. 228-259.
- Toledo, V. 1999. La diversidad biológica en México, nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencias.* 34: 48-59.
- US Fish and Wildlife Service, Conserving the nature of America, disponible en: <http://www.fws.gov/>. 12 Enero 2010
- Valdez, R., Guzman, J., Abarca, F., Tarango-Arámula, L., Clemente, F. 2006. Wildlife conservation and management in Mexico *Wildlife Soc. Bull.*: 34(2): 270-282.
- Valtierra, M. y García A. 1997. La reserva de la biosfera Chamela-Cuixmala y la conservación de una población de *Crocodylus acutus* en la costa de Jalisco, México. En: *Memorias de la IV Reunión del CSG*. Villahermosa, Tabasco, México. Centro Regional de Innovaciones Agroindustrial. México: 221-227.
- Weber, J. L. and May, P. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Human Gen.* 44: 388-396.
- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human DNA (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics.* 7: 524-530.
- Weichert, C. 1966. *Elementos de Anatomía de los Cordados*: McGraw-Hill. España: 16, 22, 32-38
- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., Lathrop, M. 1992. A second generation linkage map of the human genome. *Nature.* 359: 794-801.
- Willi, Y., Van Buskirk, J., Hoffmann, A. 2006. Limits to the adaptive potential of small populations. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:433-358.

- Winter, A. K., Fredholm, M., Thomsen, P. D. 1992. Variable (dG-dT)_n.(dC-dA)_n sequences in the porcine genome. *Genomics*. 12: 281-288.
- Womack, J. E. and Kata, S. R. 1995. Bovine genome mapping: evolutionary inference and the power of comparative genomics. *Curr. Opinion Gen. Develop.* 5: 725-733.
- Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by Fstatistics with special regard to system of mating. *Evolution*.19: 395-420.
- Yi-Quan, W., Wei-Quan, Z., Lei, H., Kai-Ya, Z., Reu-Ping, W. 2006. Genetic diversity of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) revealed by AFLP analysis: an implication on the management of captive conservation. *Biodiversity and Conservation*. 15: 2945-2955
- Yue, G., Beeckmann, P., Bartenschlager, H., Moser, G., Geldermann, H. 1999. Rapid and precise genotyping of porcine microsatellite. *Electrophoresis*. 20: 3358-3363.
- Zucoloto, R., Martinis, L., Lehmann, L. 2002. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. *J. Exp. Zool. (Mol Dev Evol.)* 294: 346-351.

ANEXO 1



FICHA DE INGRESO, EGRESO Y REGISTRO BIOMÉTRICO DE
 COCODRILOS.
 UMA "CENTRO UNIVERSITARIO DE LA COSTA REPTILARIO CIPACTLI"
 CLAVE INE/CITES/DGVS-CR-IN-0610-JAL/OO

Fecha de registro e ingreso _____

Lugar de captura y motivo de la misma: _____

Depositador _____

No. de organismo: _____

Status actual: libre: _____ cautivo: _____ muerto: _____

Fecha y lugar de liberación (según sea el caso): _____

Tabla de datos morfométricos y de secuencia de escamas

Valores morfométricos	Secuencia de escamas
Longitud total:	Cervicales:
Longitud cloaca:	Cinco dorsales:
Largo del hocico:	Dorsales totales:
Ancho frente a los ojos:	Dobles caudales
Ancho del hocico medio	Simple caudales:
Ancho del hocico en la punta:	SEXO:
Peso:	

Notas:

ANEXO 2

Extracción y purificación de ADN de sangre con la técnica salina

1. Poner 0.3 ml de sangre con anticoagulante EDTA en tubos Eppendorf de 1.5 o 2 ml.
2. Agua destilada fría de 1.5 a 2 ml y mezclar.
3. Centrifugar a 12000rpm por 5 min a 4°C
4. Tirar sobrenadante con pipeta o decantar y quedarse con paquete sedimento.
5. Agregar de 1.5 a 2 ml de agua destilada.
6. Mezclar con vórtex.
7. Centrifugar a 12000rpm por 5 min.
8. Pipetear o decantar para dejar sedimento.
9. Agregar 1 ml de solución Lisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS).
10. Mezclar con vortex (deshacer paquete con punta si es necesario).
11. Agregar 50 µg/ml de proteinasa K e incubar a 65° C por una hora. Deshacer paquete con vórtex.
12. Agregar NaCl 2 M final. Agitar con vórtex por 15 segundos y centrifugar a 12000rpm por 10 min a 4°C.
13. Recuperar sobrenadante en tubo nuevo de 1.5 ml.
14. Precipitar con (alcohol absoluto) isopropanol 1 a 1, precipitar a -20° C por 15 min. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min, recuperar pastilla (tirar sobrenadante).
15. Suspender en 200 µl de etanol 70%. Mezclar con vórtex y centrifugar a 14,000 rpm por 10 min, recuperar pastilla (tirar sobrenadante).
16. Secar por 2 horas a 42°C.
17. Suspender en 100 a 250 µl de EDTA 1 mM o en agua bidestilada desionizada para guardar a -20°C. Antes de guardar suspender bien el ADN a 50°C, cuidando de no degradar por alta temperatura.

ANEXO 3

Extracción y purificación de ADN de sangre

1. Centrifugar muestra recolectada por 5 min a 1,500 rpm
2. Eliminar sobrenadante
3. Agregar 2ml de SRL (10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl)
4. Centrifugar 10 min a 3,000 rpm
5. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente evitando perder el pellet en el fondo del tubo (contiene los leucocitos)
6. Añadir 1ml buffer SRL y disolver el pellet de glóbulos blancos (GB) suavemente, hasta que desaparezcan los aglomerados que pudieran volver a encerrar los glóbulos rojos.
7. Transferir el homogeneizado a un tubo de 1.5 ml.
8. Centrifugar 15 min a 13,000 rpm
9. Eliminar el sobrenadante (el pellet debe estar bien compacto).
10. Volver a añadir 1 ml de buffer SRL, resuspender el precipitado
11. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm.
12. Repetir el paso 7 hasta que se observe un pellet y un sobrenadante de color blanco
13. Una vez eliminado el sobrenadante de la última centrifugación, añadir 0.9 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA)
14. Añadir 25 µl de proteinasa K (10 mg/ml)
15. Añadir 60 µl de EDTA 0.5 M + 60 µl de SDS 10% y agitar suavemente
16. Incubar con agitación suave 2 horas a 50°C
17. 13- Añadir 400 µl de NaCl 6M y agitar fuertemente
18. Centrifugar 20 min a 13,000 rpm
19. Recoger el sobrenadante (debe ser translúcido) y transferirlo a nuevos tubos de 1.5 ml (unos 400 µl por tubo)
20. Añadir a cada tubo 1 ml de etanol absoluto y mezclar por inversión. Después de 1 min aparecerá un precipitado en forma de "medusa".
21. Incubar a -20°C durante al menos 1 h o toda la noche.
22. Centrifugar a 13,000 rpm, 4°C, 20 min
23. Eliminar sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente

24. Agregar 15 μ l de TE
25. Incubar 10 min a 37°C.

ANEXO 4

Extracción y purificación de ADN de coágulo de sangre

1. Pesar tubo de centrifuga vacío
2. Obtener coágulo de la muestra y colocar en tubo de centrifuga para pesar
3. Tomar la mitad del coágulo y pasar a un nuevo tubo
4. Por cada 200mg de muestra agregar 1ml de solución de lisis
5. Por cada ml de solución de lisis agregar 200 μ g de proteinasa K
6. Incubar a 37°C
7. Preparar alícuotas en tubos Eppendorf de 1.5ml
8. Agregar 500 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isamilico (24:25:1)
9. Centrifugar a 10,000rpm por 2min
10. Colocar sobrenadante en nuevos tubos
11. Agregar nuevamente 500 μ l de fenol/cloroformo/ alcohol isoamilico
12. Centrifugar a 10,000rpm por 2 min
13. Repetir el paso 8 hasta que el sobrenadante que se obtenga se vea traslúcido
14. Agregar 50 μ l de acetato de sodio
15. Agregar 1ml de etanol absoluto
16. Centrifugar a 12,000rpm por 12 min
17. Eliminar sobrenadante
18. Resuspender los pelets en 15 μ l de TE
19. Dejar a baño María por 20min

ANEXO 5

Registro de los cocodrilos empleados en el estudio

Nombre / No. Registro	Muestra
Arnold	Q1
No. 445	Q2
No. 459	Q3
No. 111	Q4
No. 58	Q5
No. 618	Q6
No. 512	Q7
Charlie	Q8
No. 461	Q9