



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN ECOLOGÍA APLICADA

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

**Evaluación de la variabilidad genética en las poblaciones de cocodrilos  
cautivos en tres UMA de México, mediante análisis molecular con  
microsatélites.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRO EN ECOLOGÍA APLICADA

PRESENTA

BIOL. GUSTAVO WOLF SANTANA TRINIDAD

Matrícula: 2142800522

COMITÉ TUTORAL

Dr. Daniel Martínez Gómez

DIRECTOR

Dr. Jorge Ignacio Servín Martínez

DIRECTOR

M. en C. Reyes López Ordaz

ASESOR





## Contenido

<b>CAPÍTULO 1. VARIABILIDAD GENÉTICA EN LAS POBLACIONES DE COCODRILOS ALOJADOS EN TRES UMA DE MÉXICO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Resumen.....	1
1.2 Introducción.....	2
1.3 Variación Genética.....	4
1.4 Objetivos.....	9
1.5 Área de estudio.....	9
1.6 Método.....	10
1.7 Literatura Citada.....	10
<b>CAPÍTULO 2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE TRES UMA DE COCODRILOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 Resumen.....	14
2.2 Introducción.....	15
2.3 Anatomía de los cocodrilos.....	15
2.4 Alimentación.....	17
2.5 Reproducción.....	17
2.6 Clasificación.....	18
2.7 Explotación.....	19
2.7.1 Explotación en México.....	20
2.8 Especies de cocodrilianos distribuidas en México.....	22
2.8.1 <i>Crocodylus moreletii</i> (Duméril y Duméril, 1951).....	23
2.8.2 <i>Crocodylus acutus</i> (Cuvier, 1807).....	24
2.8.3 <i>Caiman crocodylus chiapsus</i> .....	25
2.9 Situación actual para las tres especies distribuidas en México.....	26
2.9.1 <i>Crocodylus moreletii</i> (Duméril y Bibron, 1851).....	26
2.9.2 <i>Crocodylus acutus</i> (Cuvier, 1807).....	27
2.9.3 <i>Caiman crocodylus</i> (Linnaeus, 1758).....	27
2.10 Antecedentes.....	27
2.11 Objetivo.....	29
2.12 Metodología.....	29
2.12.1 Manipulación de organismos.....	29
2.12.2 Toma de datos.....	32

2.13 Resultados y Discusión.....	35
2.14 Conclusiones.....	37
2.15 Literatura citada .....	38
<b>CAPÍTULO 3. VARIACIÓN GENÉTICA EN TRES UMA DE MÉXICO .....</b>	<b>41</b>
3.1 Resumen.....	41
3.2 Introducción .....	42
3.3 Aprovechamiento en cautiverio.....	43
3.4 Las Unidades de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento ....	44
Sustentable de la Vida Silvestre (UMA).....	44
3.4.1 Tipos de UMA.....	45
3.4.2 Creación de las UMA .....	45
3.5 Problemática.....	46
3.6 Variación Genética.....	47
3.7 Polimorfismos Genéticos.....	48
3.8 Consanguinidad.....	49
3.9 Marcadores moleculares .....	49
3.10 Microsatélites .....	50
3.11 Microsatélites para el género <i>Crocodylus</i> .....	51
3.12 Objetivo.....	57
3.13 Metodología.....	57
3.13.1 Toma de muestras .....	57
3.13.2 Trabajo de laboratorio .....	59
3.14 Análisis de los datos .....	63
3.15 Resultados.....	64
3.15.1 Número de alelos .....	64
3.15.2 Frecuencias alélicas .....	65
3.15.3 Heterocigosidad Observada y Heterocigosidad Esperada .....	68
3.15.4 Equilibrio de Hardy Weinberg.....	69
3.15.5 Estructura de la población.....	70
3.15.6 Distancia Genética.....	72
3.15.7 Identidad Genética (Nei, 1972).....	72
3.15.8 Estadísticos de F (Fis, Fit, Fst).....	73

3.16 Relaciones entre organismos .....	74
3.17 Discusión .....	76
3.18 Conclusiones.....	84
3.19 Literatura citada .....	86
<b>CAPÍTULO 4. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA.....</b>	<b>92</b>
4.1 Resumen .....	92
4.2 Introducción .....	92
4.3 Antecedentes.....	93
4.5 Descripción de actividades .....	95
4.6 manual .....	96
4.7 Literatura citada.....	169



## CAPÍTULO 1. VARIABILIDAD GENÉTICA EN LAS POBLACIONES DE COCODRILOS ALOJADOS EN TRES UMA DE MÉXICO.

### 1.1 Resumen

Los cocodrilianos han logrado perdurar a través del tiempo como parte fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas donde habitan. Desafortunadamente el incremento en las actividades antropogénicas ha hecho que las poblaciones de cocodrilianos disminuyan drásticamente, lo cual ha llevado a que 13 de las 23 especies existentes se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. Como respuesta a la disminución de las poblaciones de cocodrilos, han surgido diferentes programas de conservación, donde la reproducción en cautiverio ha sido una de las más relevantes. Actualmente, el aprovechamiento *ex-situ* de los cocodrilianos en México se da a través de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), las cuales han conseguido resultados positivos en cuanto al número de organismos que ahí se mantienen, pues este se ha incrementado considerablemente. Sin embargo, en la mayoría de los casos la planeación de estrategias para la conservación de las especies, se realiza en ausencia de la información genética necesaria, lo cual podría pasar por alto un deterioro en la variabilidad genética, afectando así la capacidad de respuesta y adaptación de las poblaciones. Por lo tanto, el evaluar la variación genética, permitirá sopesar los posibles conflictos de naturaleza genética y hacer una valoración de las acciones de manejo que se pueden llevar a cabo para minimizar los riesgos.

Palabras clave: Cocodrilos, variación genética, conservación, cautiverio, extinción.



## 1.2 Introducción

Las diversas especies de cocodrilianos han logrado perdurar a través del tiempo como parte fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas donde habitan. Son considerados también especies clave, pues su presencia y actividades de mantenimiento, control y recuperación, contribuyen de manera importante a mantener la estructura y función del ecosistema, influyendo directamente en las poblaciones de las especies con las que cohabitan (Cedillo-Leal *et al.*, 2011). A nivel mundial existen 23 especies del orden Crocodylia (Ross, 1998) de las cuales, diez se distribuyen en las diferentes regiones de Latinoamérica (Piña *et al.*, 2004). De estas especies, tres se encuentran en las regiones tropicales de México: *Crocodylus acutus* (cocodrilo de río), *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) que pertenecen a la familia Crocodylidae; y el *Caiman crocodylus chiapasius* (caimán) de la familia Alligatoridae (Álvarez del Toro y Singler, 2001; Hernández *et al.*, 2006). Las poblaciones de prácticamente todas las especies de cocodrilidos se han visto drásticamente afectadas, principalmente por el gran incremento en las actividades antropogénicas como: la sobreexplotación y la destrucción o modificación de sus hábitats. Esto ha provocado que actualmente 13 de las 23 especies existentes se encuentren amenazadas, en peligro de extinción y/o con algún estatus de riesgo a nivel nacional e internacional (Hernández *et al.*, 2006; NOM-ECOL-059-2010; CITES, 2010; IUCN, 2010). Como respuesta a la disminución de las poblaciones de cocodrilos, han surgido diferentes programas de conservación, los cuales se han enfocado principalmente en dos estrategias; evitar la disminución de las poblaciones naturales por medio de vedas, mejorando y protegiendo también el hábitat; y por medio de la reproducción y cría en cautiverio. Esta última estrategia, tiene como factor limitante, las tácticas de manejo y conservación desarrolladas para estos animales (Casas-Andreu *et al.*, 2011; Serna-Lagunes *et al.*, 2012). Como parte de estas estrategias en 1970, en México, el Gobierno Federal declaró una veda total y permanente para las tres especies de cocodrilianos que se distribuyen en el país. Sin embargo, al ser la explotación de estos organismos una actividad económicamente relevante, los pobladores locales solicitaron permisos para continuar haciendo uso del recurso,

promoviendo así el establecimiento de criaderos intensivos para fines de conservación y comercialización de la piel, carne y otros derivados de estos organismos (INE, 2000; Hernández *et al.*, 2006; Serna-Lagunes, 2010). Actualmente, el aprovechamiento *ex-situ* de los cocodrilianos en México se da a través de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), las cuales buscan promover esquemas alternativos de producción compatibles con el cuidado del ambiente (CONAFOR, 2009; Serna-Lagunes *et al.*, 2012), pues la conservación *ex-situ* requiere la aplicación de gran variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que garanticen la sobrevivencia de individuos o poblaciones fuera de su hábitat (Gordillo Chávez, 2013). Por lo que las UMA, pretenden representar una conciliación entre la conservación y el aprovechamiento de la vida silvestre a través del uso racional, ordenado y planificado de los recursos naturales (Robles-de Benito, 2009). De tal manera que uno de sus objetivos principales es; reducir el riesgo de extinción de especies o poblaciones por medio de la conservación y/o reproducción *ex-situ*, con la idea de en un futuro, poder restablecer las poblaciones naturales en el hábitat donde existieron originalmente (Gordillo Chávez, 2013). A la fecha, la reproducción *ex-situ* en las UMA de carácter intensivo ha resultado benéfica para muchas especies, pues el número de organismos que ahí se mantienen se ha incrementado considerablemente; sin embargo, una gran disminución de las poblaciones como lo sucedido con los cocodrilianos, trae consigo, la pérdida de la diversidad genética: por cual es importante conocer la estructura genética de las poblaciones naturales y en cautiverio, pues una nula o inadecuada evaluación de las poblaciones que se manejan *ex-situ*, podría afectar la viabilidad de las poblaciones a largo plazo, existiendo la posibilidad de un deterioro en la variación genética, así como del tamaño de la población efectiva, aumentando de esta manera los procesos de endogamia en las poblaciones, afectando así su capacidad de respuesta y adaptación a los cambios ambientales (Serna-Lagunes y Díaz-Rivera, 2011; Bishop *et al.*, 2009; Gallina-Tessaro *et al.*, 2009).

### 1.3 Variación Genética

En la conservación, desde el punto de vista genético, es fundamental el estudio de la variación existente, entre y dentro de los individuos de una población (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Los cambios en la Variabilidad Genética (VG) son de suma importancia para la conservación de las especies, ya que, si las poblaciones mantienen una alta diversidad genética, la probabilidad de que puedan responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales es mayor (Hedrick, 2001). En cambio, el riesgo de extinción es más alto si se presenta reducción en la variación genotípica, pues una baja en la VG está altamente relacionada con una disminución en la eficacia biológica y la pérdida del potencial adaptativo, dando como resultado, la incapacidad para responder a los cambios del medio ambiente (Godoy, 2009; Eguiarte *et al.*, 2007)

En los últimos años la genética de poblaciones ha sido sujeta a cambios revolucionarios por el desarrollo en las técnicas de biología molecular, abriendo la puerta para el estudio de problemas que hace pocos años nos parecían insolubles. En especial y luego del descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por medio de la cual, se ha podido profundizar en el estudio de la genética a nivel molecular a través del uso de marcadores genéticos para resolver problemas poblacionales. Desde el punto de vista genético, es importante estudiar, determinar y medir la variación existente, entre y dentro de los individuos de una población (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Eguiarte *et al.*, 2007). La variación en el interior de las especies es fácilmente perceptible; los individuos se distinguen por sus caracteres fenotípicos, sin embargo, estas diferencias están muy influenciadas por el ambiente. (Jiménez y Collada, 2000). La variación en la información genética surge por mutaciones y recombinaciones del material hereditario y es parte fundamental en la evolución de las especies, pues de estas variaciones dependerá la adaptación a nuevas condiciones y la especiación (Hedrick, 2001; Jiménez y Collada, 2000).

La diversidad genética (DG) es un componente importante de la biodiversidad que debe ser estudiado y preservado (Eguiarte *et al.*, 2007; Jiménez y Collada, 2000). La IUCN, (*International Union for Conservation of Nature Resources*), reconoce

que en la naturaleza deben conservarse: la diversidad genética, la diversidad de especies y la diversidad de ecosistemas. Evaluar la diversidad genética de las especies en peligro, permite sopesar los posibles conflictos de naturaleza genética y hacer una valoración de las acciones de manejo que se pueden llevar a cabo para minimizar los riesgos (Godoy, 2009). Contrario a esto la falta de información y la inadecuada evaluación de las poblaciones que se manejan, pueden llegar a afectar negativamente a las especies, causando a largo plazo un deterioro en la variabilidad genética de las mismas, afectando su capacidad de respuesta y adaptación (Gallina-Tessaro *et al.*, 2009).

Actualmente la planeación de estrategias para la conservación de las especies, con frecuencia se realiza en ausencia de la información genética necesaria. Dicha información resulta indispensable para establecer programas de conservación, pues el no tomar en cuenta los procesos evolutivos y la falta de información genética a la hora de gestionar los planes de manejo, puede causar confusiones con respecto a los problemas que se presentan posteriormente en las poblaciones que se manejan (Mace y Puruis, 2008). Por lo tanto, si se pretende llevar a cabo planes de manejo y conservación, es importante tomar en cuenta los procesos evolutivos y conocer los niveles de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, con el fin de llevar a cabo acciones que garanticen su viabilidad a largo plazo, ya que es por medio de estos procesos, que los organismos mantienen su habilidad de adaptación y evolución a nuevas circunstancias (Mace y Puruis, 2008; Serna Lagunes y Díaz Rivera, 2011).

El estudio de la genética en áreas de la ecología y la evolución no ha dejado de crecer en las últimas décadas, el ámbito de la conservación biológica no ha sido una excepción y este proceso ha dado lugar a la disciplina de la *genética de la conservación*. Por medio de la cual, se busca generar información que contribuya a la conservación de las especies, previniendo el desgaste del potencial adaptativo asociado a la pérdida de diversidad genética, que junto a la disminución de eficacia biológica resultante de la acumulación de endogamia y de alelos deletéreos, puede generar un conflicto de naturaleza genética, afectando de esta

manera la estructura de las comunidades y los procesos ecosistémicos, poniendo en riesgo la persistencia de las especies (Godoy, 2009).

Diversos estudios se han realizado con el fin de determinar la estructura genética de las poblaciones, generando de esta manera información relevante para la conservación de las especies silvestres (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Tal es el caso de Kotzé *et al.* (2014) que realizaron un estudio poblacional a nivel molecular para determinar las relaciones existentes entre tres poblaciones de rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) en África, con base en la estructura genética de la población. Los resultados obtenidos por estos investigadores demostraron que las poblaciones estudiadas poseían dos grupos de genes muy relacionados, además, de identificar migrantes entre fundadores de las tres poblaciones, mostrando con ello una conectividad histórica entre estos grupos de genes en el sudeste de África. Por su parte Kutschera *et al.* (2015) analizaron la diversidad genética en osos polares (*Ursus maritimus*), comparando la información genética de 4 osos vagabundos, con la obtenida de poblaciones conocidas. Demostrando así, que los osos vagabundos son de gran importancia para las poblaciones establecidas, pues la alta variabilidad encontrada en estos individuos, representa nuevas variantes genéticas para las poblaciones.

Por otra parte, Hendricks *et al.* (2017) analizaron la relación de la variabilidad genética con un cáncer epidémico transmisible, que ha llevado a una drástica disminución de la población de demonios de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*). Los resultados mostraron que los bajos niveles de diversidad genética puede ser un factor determinante para la rápida propagación de una enfermedad, sin embargo, es posible que las variaciones genéticas individuales en los demonios de Tasmania puedan permitir la resistencia a dicha enfermedad, a pesar de los bajos niveles de diversidad genética. Así mismo, Monge *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la pérdida y fragmentación del hábitat sobre la variabilidad genética de la guacamaya escarlata (*Ara macao*), encontrando una diferenciación marcada entre poblaciones y una variación genética de moderada a alta, en función a la fragmentación del hábitat.

En la misma línea de investigación diversos autores han resaltado la importancia de los estudios genéticos asociados a la conservación de los cocodrilianos. Glen *et al.* (1998), ante la necesidad de contar con marcadores genéticos con un alto grado de polimorfismo e informativos para todas las especies de cocodrilos, señalaron la capacidad de los marcadores desarrollados para *A. mississippiensis* para analizar otras especies de la familia *Alligatoridae*. Asimismo, Dever y Densmore, (2001) encontraron un alto nivel de polimorfismo en varios *loci* con marcadores desarrollados originalmente para *C. johnstoni*, aplicados en *C. moreletii*. Por su parte, FitzSimmons *et al.* (2000), desarrollaron la primera biblioteca de microsatélites para *Crocodylus* a partir de ADN de *C. johnstoni*, *C. porosus* y *C. acutus*.

Adicionalmente Flint *et al.* (2000) compararon los niveles de variación genética de una población cautiva de *Crocodylus niloticus* con datos obtenidos con anterioridad en poblaciones silvestres, esto con el fin de determinar los efectos del cautiverio en la variabilidad genética en poblaciones de estas especies, obteniendo bajos niveles de variación para las poblaciones criadas en cautiverio. Serna-Lagunes y Díaz Rivera (2011), estudiaron la variabilidad genética de poblaciones en cautiverio en una granja de *C. moreletii* en México, observándose que el  $N_e$  (tamaño efectivo de la población) en cautiverio debe ser mayor a 900 cocodrilos en una proporción de 1 macho por cada 2.5 hembras; con esto se puede llegar a conservar hasta el 94 % de la Variación genética de la población. Bishop *et al.* (2009), realizaron un estudio de la estructura genética en poblaciones de *Crocodylus niloticus* manejadas en granjas comerciales de Sudáfrica empleando microsatélites desarrollados para *C. johnstoni*, mostrando que estos marcadores moleculares pueden emplearse en especies distintas de las que fueron diseñados (FitzSimmons *et al.*, 2000).

Asimismo, diferentes investigadores se han enfocado en el estudio de la estructura genética de las poblaciones de cocodrilos, tal es el caso de Davis en 2001 quien evaluó la estructura genética de seis poblaciones de *Alligatore mississippiensis* en Estados Unidos. Dever *et al.* (2002), determinaron la composición genética de las poblaciones de *C. moreletii* en siete localidades del centro norte de Belice, y De

Thoisy *et al.*, (2006) estudió y comparó la estructura genética de siete poblaciones de *Melanosuchus niger* (Caimán negro) en Sudamérica. De esta manera y por medio de trabajos como los mencionados anteriormente, se ha podido generar información importante acerca de la estructura genética de las poblaciones de cocodrilianos, generando así, datos que resultan de gran importancia para para el correcto manejo y conservación de las mismas.

Otra parte importante que ha sido relevante en la investigación genética de cocodrilidos es el estudio de hibridaciones entre las diferentes especies de estos, pues aunque algunos datos sugieren que cierto nivel de hibridación siempre ha ocurrido en la naturaleza, la hibridación e introgresión mediada por el hombre puede conducir a la extinción de poblaciones naturales, con implicaciones biológicas graves que esto tendría, al afectar las trayectorias evolutivas de las especies (Rodríguez *et al.*, 2008). El uso de marcadores moleculares en cocodrilianos ha permitido demostrar la presencia de individuos híbridos entre *C. moreletii* y *C. acutus* en Belice. Ray *et al.* (2004) realizaron un análisis de secuencias de ADN mitocondrial, mostrando que un haplotipo característico de *C. acutus* estaba presente en *C. moreletii*. Por otra parte, en México en la península de Yucatán la presencia de anomalías morfológicas en los organismos capturados de poblaciones silvestres dio base para realizar análisis moleculares de ADN mitocondrial, con lo que se demostró la presencia de individuos híbridos interespecíficos en esta parte del país (Cedeño- Vázquez *et al.*, 2008). Estudios posteriores realizados por medio de microsatélites en la península de Yucatán, aportan más evidencias de la presencia de cocodrilos híbridos en esta región del país (Rodríguez *et al.*, 2008).

## 1.4 Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de cocodrilos alojadas en tres UMA establecidas en el territorio Nacional, con el fin de establecer bases para programas que aseguren la viabilidad a largo plazo de las UMA.

### Objetivos particulares

1. Describir las características morfológicas de los organismos muestreados.
2. Evaluar la variabilidad genética existente para cada una de las UMA muestreadas.
3. Con base en los resultados establecer un diagnóstico de situación para cada una de las poblaciones muestreadas.

## 1.5 Área de estudio

El estudio se realizó en tres Unidades de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) de la república mexicana; el Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas (UMA CICEA), la UMA San Fernando ambas ubicadas en el estado de Tabasco y UMA La Colorada ubicada en el estado de Colima.

La UMA CICEA a cargo del M. en C. Marco Antonio López Luna, se encuentra en el área suburbana, dentro de las instalaciones de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en la carretera Villahermosa-Cárdenas, entronque Bosque de Saloya en las coordenadas 17°59'24.45" latitud Norte y 92°58'29.48" Longitud Oeste; Villahermosa, Tabasco. Cuenta con una superficie total de cuatro hectáreas, de las cuales aproximadamente el 60% se encuentra cubierta de agua (Gordillo Chávez, 2013).

La UMA San Fernando a cargo del Técnico Eloy Ramírez Gutiérrez, localizada en Chilapa 1era sección Centla, Tabasco.

La UMA La Colorada llamada también "Santuario de Cocodrilos la Colorada", se localiza a una distancia aproximada de 7 kilómetros al este de Tecomán. En una zona de influencia inmediata a dos cuerpos lacustres que son la Laguna de Alcuahue y La laguna la Colorada. La Laguna La Colorada tiene un área



aproximada de 7.8 ha (0.08 km<sup>2</sup>), mientras que la del Alcu zahue tiene un área aproximada de 250 ha (2.5 km<sup>2</sup>).

### **1.6 Método**

Para la elaboración de este trabajo fue necesaria la visita a cada una de las UMA mencionadas anteriormente, con el fin de obtener las muestras necesarias para los análisis en el laboratorio. Se llevó a cabo el manejo y contención de 82 organismos, de los cuales se tomaron datos morfológicos y se obtuvo una muestra de sangre y/o tejido, dependiendo de las condiciones y facilidades. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, donde se realizó la extracción y cuantificación del ADN de las muestras y se verificó la integridad del mismo. Posteriormente se usaron cebadores marcados con fluorescencia, los cuales fueron amplificados por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una vez amplificados los productos, fueron enviados a la Universidad de Illinois para su análisis. Con los datos obtenidos se determinó la estructura genética de las 3 poblaciones muestreadas, empleando distinto software de análisis genético.

### **1.7 Literatura Citada**

Álvarez del Toro, M. y L. Singler. 2001. Los Crocodylia de México 1ª Edición. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C. México, PROFEPA. 134 p.

- Aranguren-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13(1): 1-6.
- Bishop, M.J., A.J. Leslie, S.L. Bourquin y C.O'Ryan. 2009. Reduced effective population size in an overex- ploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Biol. Conserv.* 142: 2335-2341.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios y R. M. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Rev. Mex. Biodiv.* Vol. 82 No. 1 México.
- Cedeño-Vázquez, J.R, D. Rodríguez, S. Calme´, J.P. Ross, L.D. Densmore III y J.B. Thorbjarnarson. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: I. Evidence from mitochondrial DNA and morphology. *J. Exp. Zool.* 309A:661–673.
- Cedillo-Leal, C., J.C. Martínez-González, F. Briones-Encina y E. Cienfuegos-Rivas. 2011. Importancia del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en los humedales costeros de Tamaulipas, México. *Cienc. Uat.* 21(3):18-23.
- CITES. 2010. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres, 31pp.
- CONAFOR. 2009. Manejo de Vida Silvestre. Manual técnico para beneficiarios. 1ª Edición. Coordinación General de Educación y Desarrollo tecnológico. México. 31pp.
- Davis, L. M., T.C. Glenn, R. M. Elsey, H. C. Dessauer, H. Sawyer Roger.2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, Alligator mississippiensis. *Molec. Ecol.*10, pp 1011-1024.
- De Thoisy, B., T. Hrbek, I.P Farias, W.R. Vasconcelos, A. Lavergne.2006. Genetic structure, population dynamics, and conservation of black caiman (*Melanosuchus niger*). *Biol. Conserv.* 133:474–482.
- Dever, J. A. and L. D. Densmore. 2001. Microsatellites in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) and their utility in addressing crocodilian population genetics questions. *J. Herp.* 35:541–544.
- Dever, J.A., R.E. Stratus, T.R. Rainwater, S.T. McMurry & L.D. Densmore. 2002. Genetic diversity, population subdivision and gene flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* 4: 1078-1091
- Eguiarte, L., V. Souza, X.Aguirre. 2007. Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM, México, 592.pp.
- Fitzsimmons, N.S., M. R. Tanksley, E. E. Forstner, R. Louis, J. Darglish, S. Gratten, Davis. 2000. Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. In G. Grigg, E Seebacher, and C. E. Franklin (eds.), *Crocodilian Biology and Evolution*, pp. 51-57.

- Flint, N.S., F.H. Van der Bank y J.P. Grobler. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA* Vol. 26 (1): 105-110.
- Gallina-Tessaro, S.A., A. Hernández-Huerta, C.A. Delfín-Alonso y A. González-Gallina. 2009. Unidades para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre en México (UMA). Retos para su correcto funcionamiento. *Rev. INE. Invest. Amb.* 1(2):143-152.
- Glenn, T. C., H. C. Dessauer & M. J. Braun, (1998). Characterization of Microsatellite DNA Loci in American Alligators. *Copeia*,(3), 591.
- Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, España, ISSN: 18(1):23-33.
- Gordillo-Chávez, J.E. 2013. Evaluación de la UMA de cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Licenciatura en Biología. 53pp.
- Hedrick P.W. 2001. Conservation genetics: where are now? *Trends.Ecol.Evol.* 16:629-636.
- Hendricks S, B. Epstein, B. Schönfeld, C. Wiench, R. Hamede, M. Jones, A. Slorfer, P. Hohenlohe. 2017. Conservation implications of limited genetic diversity and population structure in Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*). *Conserv. Genet.*; 18(4): 977–982.
- Hernández, H., R. García-de Quevedo y P.S. Hernández. 2006. Los cocodrilos de la costa del pacifico occidental (Michoacán, Colima y Jalisco) de México. En *Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán*. Instituto Nacional de Pesca. 1ra Ed. 375-389.
- INE. 2000. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los *Crocodylia* de México (COMACROM). Instituto Nacional de Ecología y Secretaria de Marina y Recursos Naturales, Distrito Federal, México.
- IUCN, 2010. Red List of Threatened Species, Version 2010.2. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources ( <http://www.iucnredlist.org>).
- Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y uso en los programas de conservación. *Investigación Agrícola, Sistemas y Recursos Forestales*, 2: 237-248.
- Kotzé, A., D. Dalton, R. du Toit, N. Anderson, & Y. Moodley. 2014. Genetic structure of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in South-eastern Africa. *Conserv. Genet.* 15, 1479–1489.
- Kutschera, V.E., C. Frosch, A. Janke, K. Joshi, Irnisson, T. Bidon, N. Lecomte , S.R. Fain, H.G. Eiken, S.B. Hagen, U. Arnason, K.L. Laidre, C. Nowak, & F. Hailer. 2016. High genetic variability of vagrant polar bears illustrates importance of population connectivity in fragmented sea ice habitats. *Animal. Conserv.* 19: 337–349.
- Mace, G.M., A. Purvis, 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molec. Ecol.*17:9-19.

- Monge O., K. Schmidt, C. Vaughan, G. Gutiérrez-Espeleta 2016. Genetic patterns and conservation of the Scarlet Macaw (*Ara macao*) in Costa Rica. *Conserv. Genet.* 17:745–750
- NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Piña C. I., A. Larriera y P. Siroski. 2004. Cocodrilos en la Región Litoral: especies, distribución geográfica, modo de vida. *Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino*. INSUGEO, Miscelánea, 12: 317 – 322.
- Ray, D.A., J.A. Dever, S.G. Platt, E.R. Rainwater, A.G. Finger, S.T. Mc Murry, M.A. Batzer, B. Barr, P.J. Stafford, J. McKnight y L.D. Densmore. 2004. Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conserv. Genet.*, 5: 449-462.
- Robles-de Benito, R. 2009. Las unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre y el corredor Biológico Mesoamericano, México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, Seri Acciones, No. 2, 130pp.
- Rodríguez, D., J.R. Cedeño-Vázquez M.R.J. Forstner, L.D. Densmore. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: II. Evidence from microsatellites. *J. Exp. Zool.* 309 A:674–686.
- Ross, J. P. 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2<sup>nd</sup> Edition. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK pp: 96
- Serna-Lagunes, R. 2010. Historia de vida y genética cuantitativa de cuatro poblaciones de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) bajo condiciones de cautiverio en el trópico mexicano. Maestría en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados. México Veracruz. 111 pp.
- Serna-Lagunes, R. y P. Díaz-Rivera. 2011. Variación genética y conservación de una población de *Crocodylus moreletii* en cautiverio. *Act. Zool. Mex.* (n.s.), 27(3): 547-56.
- Serna-Lagunes, R., D. González y P. Díaz-Rivera. 2012. Variabilidad genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae) mediante el uso de marcadores microsatelitales. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 60 (1): 425-436.

## CAPÍTULO 2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE TRES UMA DE COCODRILOS.

### 2.1 Resumen

El Orden Crocodylia se distribuye alrededor del mundo con 23 especies, las cuales son fundamentales para mantener la estructura y funcionamiento de los ecosistemas. Desafortunadamente, la sobreexplotación y destrucción de sus hábitats, ha llevado a varias de estas especies al borde de la extinción. Por lo que se ha tenido que establecer vedas y diversas estrategias de conservación, entre las cuales, una de las más relevantes fue la reproducción *ex-situ*. Actualmente, en México las UMA buscan reducir el riesgo de extinción en las especies por medio de la reproducción *ex-situ*, por lo cual es importante mantener un registro y estar al tanto de los cambios que puedan presentarse en los organismos destinados al cautiverio. En este estudio se llevó a cabo la contención 82 organismos, de los cuales se obtuvieron los datos necesarios para determinar la estructura de la población de cada una de las UMA. En la UMA colorada se manipularon total de 22 organismos de los cuales, 4 fueron hembras, 2 en etapa sub-adulta, 1 adulta y una adulta grande y 18 machos, de los cuales, 12 eran adultos y 6 eran adultos grandes. Para la población de San Fernando se manejaron 30 organismos, 29 de estos fueron hembras en etapa juvenil y solo hubo un macho en la misma etapa. Por último, el CICEA tuvo un total de 30 individuos, 19 de estas eran hembras sub adultas y 12 adultas, los 11 individuos restantes fueron machos, 3 sub adultos, 7 adultos y 1 adulto grande. Para las tres UMA muestreadas no se encontraron anomalías en la morfología de los organismos más allá de heridas ocasionadas por peleas o accidentes comunes ocasionados por el mismo aislamiento

Palabras clave: cocodrilos, contención, especies, clasificación, estructura poblacional.

## 2.2 Introducción

Los cocodrilos y caimanes han habitado la tierra desde hace millones de años, perdurando hasta la actualidad sin presentar grandes cambios, debido a un eficiente diseño corporal (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011), contando actualmente con 23 especies distribuidas a nivel mundial (Ross, 1998). Estos organismos representan un recurso natural de suma importancia para los ecosistemas en los que habitan, y son considerados como una especie clave debido a que desempeñan un papel fundamental en la estructura y funcionamiento de los hábitats costeros, pues contribuyen de manera directa a diversos procesos ecológicos. Mediante su desplazamiento entre cuerpos de agua mantienen canales de comunicación abiertos entre los mismos, además de transportar propágulos vegetales y microorganismos al moverse de un cuerpo de agua a otro (Casas-Andreu y Barrios, 2003). Construyen refugios a las orillas de los cuerpos de agua, los cuales en época de sequía sirven como reservorios de agua y único resguardo para peces, aves y otras especies acuáticas y semiacuáticas, lo que contribuye a mantener la biodiversidad en los pantanos y esteros (Aguilar, 2005, Cedillo-Leal *et al.*, 2011). Así mismo cumplen el papel trófico como depredador tope en el ecosistema (Hernández *et al.*, 2006), controlando las poblaciones de vertebrados e invertebrados por medio de una depredación selectiva (Aguilar, 2005), también incorporan nutrientes al medio acuático mediante sus heces. (Casas-Andreu y Barrios 2003). De esta manera la presencia y actividades de los cocodrilianos influyen la trayectoria de las poblaciones locales de las especies que cohabitan con ellos, pudiendo modificar el aspecto y dinámica del ambiente. (Cedillo-Leal *et al.*, 2011; Sanchez-Herrera *et al.*, 2011).

## 2.3 Anatomía de los cocodrilos.

Las diferentes especies de cocodrilianos muestran un patrón estructural muy homogéneo (Casas-Andreu *et al.*, 2013); son reptiles de mediano a gran tamaño, de hábitos anfibios. Tienen el cuerpo alargado, sus extremidades son cortas y fuertemente desarrolladas, su cola larga y poderosa, presenta una forma redondeada en la base y se va comprimiendo hacia la porción distal (Álvarez del toro y Singler, 2001).

La cabeza es ancha y aplanada, provista de fuertes mandíbulas, cuenta con numerosos dientes prensiles, cónicos y agudos e implantados en alveolos que se abren en los maxilares, formando una hilera regular. Los ojos están bien desarrollados, sobresalen de la línea de la cabeza, lo cual le permite asomar los ojos por encima del agua estando sumergido. Tienen una pupila vertical y presentan una excelente visión tanto diurna como nocturna, tienen un tercer parpado que se denomina también membrana nictitante, se encuentra por debajo de los otros dos y se ancla en el ángulo interno del ojo, esto les permite ver con claridad cuando están debajo del agua (Young, 1980). También cuentan con una capa que se encuentra detrás de la retina llamada *tapetum lucidum*, esta refleja la luz, lo que les confiere la habilidad de ver cuándo existe poca iluminación. (Casas-Andreu *et al.*, 2013)

En el plano lateral de la región temporal se encuentran los oídos, que son dos aberturas alargadas que pueden cerrarse a voluntad (Álvarez del toro y Singler, 2001). Las fosas nasales son valvulares, se abren en el extremo del hocico y el aire es conducido hacia atrás por medio de un largo tubo, se puede cerrar fuertemente por medio de esfínteres musculares para impedir la entrada de agua (Young, 1980). Los orificios nasales se encuentran en la punta del hocico y al igual que los ojos sobresalen por medio de una prominencia carnosa, lo que le permite respirar con prácticamente todo el cuerpo sumergido (Álvarez del toro y Singler, 2001).

Cuentan, con un paladar secundario completo, el cual presenta una válvula palatal que les permite respirar cuando tienen la boca llena de agua, la respiración es posible ya que los pasajes nasales se abren en la garganta y no en la boca quedando estas cavidades separadas por una cortina de piel. De este modo también puede llevar a sus presas a las profundidades sin que el agua penetre en la garganta (Casas-Andreu *et al.*, 2013).

Son organismo denominados ectotermos, que dependen de la temperatura ambiental pues no poseen un mecanismo regulador de la misma (Young, 1980), debido a esto buscan regular su temperatura asoleándose, postrándose bajo la

sombra o sumergiéndose en el agua. Están recubiertos por una piel gruesa y queratinizada, con un recubrimiento de queratina que le confiere mayor fuerza. Tanto en la región dorsal como en el cuello ostentan inclusiones óseas conocidas como osteodermos (Casas-Andreu *et al.*, 2013).

#### **2.4 Alimentación**

Los cocodrilidos son depredadores estrictamente carnívoros, su habilidad para destrozar es poca ya que sus dientes están diseñados para atrapar y retener. Su método de caza está muy bien diseñado, esperan su presa debajo del agua, se acercan sumergidos, la atrapan con un rápido movimiento, la inmovilizan y la ahogan, son oportunistas y en ocasiones incluso carroñeros. (Casas-Andreu *et al.*, 2013; Escobedo-Galvan,2003). La alimentación dependerá del tamaño del organismo; los neonatos se alimentan de insectos acuáticos y terrestres, mientras que los juveniles se alimentan de moluscos, peces, crustáceos, culebras, invertebrados, ranas, tortugas, aves y algunos pequeños mamíferos. Cuando alcanzan la etapa adulta, estos se alimentan de distintas clases de animales sin importar el tamaño, teniendo entre sus presas incluso animales domésticos (CITES,2010; Casas-Andreu y Barrios, 2003; Hernández *et al.*, 2006).

#### **2.5 Reproducción**

Tumbes Lance (1987) determinó que los cocodrilos han ligado su ciclo reproductivo a los cambios estacionales de acuerdo al ambiente. El dimorfismo sexual se reduce al tamaño, siendo el macho el que sobrepasa a la hembra. (Fontanilla-Pérez *et al.*, 2000). En la mayoría de las especies las hembras alcanzan su madurez sexual aproximadamente entre los 8 y los 10 años de edad. Los machos parecen mostrar actividad sexual después de los 2.5 m en estado silvestre, sin embargo, parece haber un patrón fisiológico que hace difícil que un macho de tallas menores a 2.5 m sea fértil (Escobedo-Galván, 2004).

La reproducción se da una sola vez al año y esta consiste en el cortejo, la anidación, la eclosión y la emergencia de las crías del nido. Los machos suelen ser muy dominantes y en época de reproducción se acentúa el instinto de territorialidad, evitando con sus enfrentamientos la reproducción de animales



enfermos o débiles. La cantidad y el tamaño de los huevos varía dependiendo de la especie entre 10 y 60 huevos por puesta (Casas-Andreu *et al.*, 2013), sin embargo, estas variaciones también pueden estar relacionadas con las características físicas y fisiológicas de la hembra, tales como edad, estadio de madurez, talla, alimentación, estrés ambiental, competencia etc. La diferenciación sexual dependerá de la temperatura del nido y el tiempo de incubación varía entre 75 y 90 días, dependiendo de la especie. (Hernández *et al.*, 2006).

En general, los cocodrilos presentan pautas de comportamiento muy complejas, con interacciones sociales, jerarquías de dominancia, vocalizaciones, alimentación coordinada y cuidado maternal (Casas-Andreu, 1995).

## 2.6 Clasificación

Los orígenes de los cocodrilos se remontan al triásico superior teniendo como ancestros al grupo de los protosuchius. Los cuales, desaparecieron hace 195 millones de años, siendo hasta el jurásico inferior que se encuentran nuevos cocodrilos del suborden Mesosuchia, que; después de una espectacular radiación adaptativa, desaparecen y dan paso, durante el cretácico, a formas más avanzadas, los eusuchios, grupo al cual pertenecen los actuales cocodrilos (Rodríguez, 2000). Los Crocodylia, han presentado una considerable diversificación a través de una compleja historia evolutiva. Sin embargo, su eficiente diseño corporal no ha tenido grandes cambios y ha conseguido permanecer desde el Cretácico hasta la época actual (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).

Los cocodrilos pertenecen a la Clase Reptilia, Subclase Archosauria, del Orden Crocodylia, el cual está representado por 23 especies distribuidas alrededor del mundo. El orden Crocodylia se divide en 3 familias (Cuadro 1): **Alligatoridae** que cuenta con 8 especies, **Crocodylidae** que se divide en dos subfamilias Crocodylinae y Tomistominae con 13 y una especie respectivamente y **Gavialidae** con una especie (Ross, 1998; Álvarez del toro y Singler, 2001; Casas-Andreu *et al.*, 2013).

**Cuadro 1. Clasificación del orden Crocodylia y las especies pertenecientes a cada familia (Ross, 1998; Casas-Andreu, 2013)**

<b>Alligatoridae</b>	<b>Crocodylus acutus</b> (American crocodile)
<b>Alligator mississippiensis</b> (American alligator)	<b>Crocodylus cataphractus</b> (slender-snouted crocodile)
<b>Alligator sinensis</b> (Chinese alligator)	<b>Crocodylus intermedius</b> (Orinoco crocodile)
<b>Caiman Crocodilus</b> ( <i>C.c.fuscus</i> , <i>C.c. apaporiensis</i> , <i>C.c. chiapasus</i> )	<b>Crocodylus johnsoni</b> (Australian freshwater crocodile)
<b>Caiman latirostris</b> (broad-snouted caiman)	<b>Crocodylus mindorensis</b> (Philippine crocodile)
<b>Caiman yacare</b> (yacaré)	<b>Crocodylus moreletii</b> (Morelet's crocodile)
<b>Melanosuchus niger</b> (black caiman)	<b>Crocodylus niloticus</b> (Nile crocodile)
<b>Paleosuchus palpebrosus</b> (dwarf caiman)	<b>Crocodylus palustris</b> (mugger)
<b>Crocodylidae (Crocodylinae)</b>	<b>Osteolaemus tetraspis</b> (dwarf crocodile)
<b>Paleosuchus trigonatus</b> (smooth-fronted caiman)	<b>Crocodylidae (Tomistominae)</b>
<b>Crocodylus novaeguineae</b> (New Guinea Crocodile)	<b>Tomistoma schlegelii</b> (tomistoma)
<b>Crocodylus porosus</b> (saltwater crocodile)	<b>Gavialidae</b>
<b>Crocodylus rhombifer</b> (Cuban crocodile)	<b>Gavialis gangeticus</b> (gharial)
<b>Crocodylus siamensis</b> (Siamese crocodile)	

## 2.7 Explotación

En la actualidad la fragmentación y destrucción de los ecosistemas, es la principal causa de la disminución de las poblaciones silvestres de los cocodrilianos. Cada año, grandes extensiones de áreas como manglares, pantanos, ciénegas, ríos estuarios y vegetación ribereña son transformados por actividades antropogénicas, sin tomar en cuenta que estos sitios son hábitat de una gran diversidad de especies. (Serna-Lagunes, 2010). Estos cambios, afectan las áreas de reproducción, alimentación y crianza de un gran número de especies, entre ellas los cocodrilos, incrementado así la mortalidad de un gran número de organismos (Escobedo-Galván, 2003). Aunado a esto, la captura y caza ilegal de los cocodrilos ha representado por mucho tiempo un grave conflicto para el desarrollo de las poblaciones de estos organismos, pues estas actividades están

principalmente relacionadas con la falta de opciones de desarrollo económico para las comunidades cercanas a las zonas donde estos habitan (Serna-Lagunes, 2010).

A nivel mundial, las diversas especies de cocodrilos han sido permanentemente perseguidas debido a que existe un amplio mercado para los productos obtenidos a partir de ellos, ya que sus pieles gruesas y durables tienen una gran demanda en la industria peletera internacional, representando así una actividad económica muy relevante (Hernández *et al.*, 2006). Sin embargo, la extracción desmedida y desordenada a la que se vieron sujetas las diversas especies de cocodrilos, provocó que hasta la fecha 13 de las 23 especies que existen en el mundo se encuentren en alguna categoría de riesgo (Cedeño-Vázquez *et al.*, 2006), entre las cuales se encuentran: amenazadas por riesgo a la extinción, dependiente de conservación, sujeta a protección especial, entre otras (IUCN, 2010; NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010; CITES, 2010).

### **2.7.1 Explotación en México**

Si bien los cocodrílidos han sido aprovechados desde tiempos ancestrales como fuente alimenticia o medicinal, la explotación de los cocodrilos para el comercio de su piel ha sido durante mucho tiempo la principal actividad económica relacionada con estos organismos (Casas-Andreu, 1995). En México existen registros en las diferentes Oficinas de Pesca de la explotación de pieles de lagarto, a partir del año 1937. Estos registros muestran que la explotación fue intensa y sostenida, pues entre 1937 y 1946 se registraba la captura y explotación de estos animales en 37 localidades del país, mientras que para 1957 y 1966 se redujo a 13 localidades, registrándose finalmente solo ocho localidades en 1967. México fue considerado desde finales del siglo pasado hasta 1970 el principal exportador de pieles a los Estados Unidos (Casas-Andreu, 1995; Gordillo Chavez, 2013).

Aun cuando la captura de cocodrilos se inició alrededor de 1870 y tuvo su esplendor en las décadas de los años treinta y cuarenta del siglo pasado. Las primeras leyes y disposiciones reglamentarias para la captura de cocodrilos se establecen para 1923, en la Ley de aguas se decreta por primera vez, una veda de octubre a febrero de cada año para las especies de cocodrilos de México. En

1927 se establece una talla mínima de captura (1.80) y se deroga la época de veda. En 1930 debido a la intensa explotación de cocodrilos, se establece una veda total para las especies del Golfo de México y se determina una nueva talla mínima (1m), con una veda total por cinco años para los estados de Oaxaca y Chiapas en la costa del Pacífico. En 1933 se vedan por cinco años los cocodrilos del Nayarit y Sinaloa y entre este año y 1939 hay un sin número de disposiciones por cuanto a tallas mínimas y vedas locales. Para 1940 se establecen dos zonas de veda: Zona A; Estados de Tamaulipas, Veracruz hasta Alvarado, Yucatán, Jalisco Colima y Michoacán, del 18 de marzo a 31 de diciembre de cada año. Zona B; Estados de Veracruz, desde Alvarado, hacia el sur, Tabasco, Campeche y Quintana Roo. También se modifican las tallas mínimas de captura. Desde 1940 y con modificaciones por cuanto a la temporada de captura y cambios en las tallas mínimas, estas disposiciones se mantienen hasta el año de 1970, que es cuando el Gobierno Federal Mexicano por medio de la Secretaría de Industria y Comercio, establece una veda total y permanente para las 3 especies de cocodrilianos (*Crocodylus acutus*, *C. moreletii* y *Caiman crocodilus chiapasus*) que se distribuyen en territorio Nacional, con lo que se terminó el comercio legal de pieles de cocodrilo (Casas-Andreu, 1995). Esta veda total permanece vigente hasta nuestros días. En el año de 1991, el Gobierno de México signó la "Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres", más comúnmente conocida como "CITES" que en su Artículo II establece sus principios fundamentales, los que están contenidos en tres apéndices, y que afectan al comercio con cocodrilos a nivel mundial (Casas-Andreu, 1995). Finalmente, en 1994 el Gobierno de México, vuelve a reglamentar la explotación de cocodrilos, en la Norma Oficial Mexicana para las especies y subespecies de la flora y fauna del País (NOM-059-ECOL-1994), determina a las dos especies del Género *Crocodylus* como especies raras y al Caimán como especie sujeta a protección especial, la cual abre la posibilidad de utilización y conservación de las especies, pero siempre bajo normas estrictas. Las leyes y disposiciones antes citadas, dejan entrever, la gran preocupación por la conservación del recurso, no obstante, el conocimiento que se tenía sobre el

mismo, era muy limitado, no tan sólo en México, sino en el resto del mundo (Casas-Andreu, 1995).

Como respuesta a la disminución de las poblaciones de cocodrilos, se implementaron vedas y diferentes estrategias para la conservación de estas especies, entre las cuales, la reproducción y cría en cautiverio, ha sido de las más relevantes (Casas-Andreu *et al.*, 2011; Serna-Lagunes *et al.*, 2012). Sin embargo, con la implementación de vedas y diferentes estrategias de conservación, aquellas personas que se beneficiaban del recurso, vieron afectados sus intereses, por lo que solicitaron permisos para continuar haciendo uso mismo, promoviendo así el establecimiento de criaderos intensivos para fines de conservación y comercialización de la piel, carne y otros derivados de estos organismos (INE, 2000; Hernández *et al.*, 2006; Serna-Lagunes, 2010). Actualmente, el aprovechamiento *ex-situ* de los cocodrilianos en México se da a través de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) (Serna-Lagunes *et al.*, 2012).

Para la reproducción *ex-situ* se requiere la aplicación de gran variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que garanticen la sobrevivencia de individuos o poblaciones fuera de su hábitat, pues su principal objetivo es, reducir el riesgo de extinción de especies o poblaciones, con la idea de en un futuro poder restablecer poblaciones nuevas en el hábitat donde estas existieron originalmente (Gordillo Chávez, 2013). Debido a esto es necesario que se lleve un registro completo de los organismos mantenidos en cautiverio, con el fin de monitorear los cambios y anomalías que pudiesen presentarse en la población.

## **2.8 Especies de cocodrilianos distribuidas en México**

En México se pueden encontrar tres especies de cocodrilianos: *Crocodylus acutus* (cocodrilo de río) y *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) pertenecientes a la familia Crocodylidae; y el *Caiman crocodilus chiapasus* (caiman) de la Familia Alligatoridae. Si bien en general el orden Crocodylia presenta similitudes, las diferencias entre estas tres especies suelen ser notables a simple vista (Hernández *et al.*, 2006).

### 2.8.1 *Crocodylus moreletii* (Duméril y Duméril, 1951)

El cocodrilo de pantano también conocido como lagarto o cocodrilo negro, pardo o de pantano, se puede encontrar en la costa del Golfo de México, desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán; Belice y norte de Guatemala (Platt *et al.*, 2010). En México ha sido reportado para los estados de: Campeche, Chiapas, Colima, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y como especie introducida en Sinaloa. Considerándose primordialmente de agua dulce, habita regularmente en arroyos, pantanos, ciénagas, lagunas que están dentro de bosques y selvas, en ríos de corriente lenta, es comúnmente observado en aguas someras y estancadas (claras o lodosas), con poco movimiento y abundante vegetación (Aguilar, 2005).

Puede distinguirse de otras especies por las series incompletas y transversales de escamas subcaudales. Además, las escamas ventrales tienen glándulas foliculares y sin botones osteodérmicos (Aguilar, 2005). Es un cocodrilo de tamaño mediano con una longitud promedio de 3 a 3.5, llegando a medir hasta 4.5 metros de longitud (Platt *et al.*, 2010; Aguilar, 2005). Tiene la cabeza ancha y aplanada y el hocico relativamente corto y redondeado en la punta, cuya longitud es 1.5 a 1.7 veces el ancho basal. Al igual que en *C. acutus* el cuarto diente mandibular es visible y se adapta a una escotadura al cerrarse el hocico (Hernández *et al.*, 2006; Aguilar 2005).

La superficie dorsal de los adultos es generalmente amarillo-olivácea, pero en algunos casos puede llegar a ser completamente negra. El área ventral es clara con tonos amarillo-cremosos (Álvarez del Toro y Singler, 2001). Las hileras de escamas en las extremidades son planas y uniformes (CITES, 2010). En la naturaleza, las hembras alcanzan la madurez sexual alrededor 7-8 años de edad (1.5 m), pero en cautiverio la madurez puede ser alcanzado por 4-5 años (1.3 m) (Platt *et al.*, 2010). La época de reproducción y anidación se presenta entre abril y principios de julio. La eclosión ocurre regularmente en los meses de agosto y septiembre, después de aproximadamente 75 a 85 días de incubación (Hernández *et al.*, 2006; Platt *et al.*, 2009; Álvarez del Toro y Singler, 2001). Para anidar las hembras construyen un nido en forma de montículo con hojarasca y vegetación

del suelo. El tamaño y número de huevos dependerá de las condiciones de la hembra (Aguilar, 2005; Casas-Andreu *et al.*, 2011).

El Cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) es una de las tres especies de cocodrilianos que se encuentran en México, esta especie es utilizada para la reproducción en cautiverio con fines comerciales debido a su buena adecuación al ambiente cautivo, su velocidad de crecimiento y a las características de su piel (Escobedo-Galván, 2004). La piel del cocodrilo de pantano es delgada para un cocodriliano y los escudos dorsales son bastante planos y más regulares que los de las otras especies, lo que permite un aprovechamiento íntegro de la misma (Álvarez del Toro y Singler, 2001).

### **2.8.2 *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807)**

Conocido también como caimán, lagarto real, lagarto amarillo, lagarto fino, cocodrilo de río, cocodrilo picudo, (Álvarez del Toro y Singler, 2001). *Crocodylus acutus* se distribuye en general en la vertiente del Atlántico y el Pacífico de México, Centro América y el norte de Sudamérica, así como las islas caribeñas de Cuba, Jamaica, Haití y República Dominicana y la punta sur de Florida, E. U. A (Gracia-Grajales *et al.*, 2009). En México ha sido reportado para los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo (Hernández *et al.*, 2006).

El cocodrilo de río es un reptil robusto que alcanza gran tamaño, existe registro de hasta 6.25 metros de longitud (Álvarez del Toro y Singler, 2001). Presenta un hocico largo y angosto, cuya longitud es de 1.75 a 2.5 veces su ancho basal, debido a estas características recibió el nombre de *C. acutus* que significa picudo o acusado (Hernández *et al.*, 2006). Los animales viejos, poseen una joroba media prefrontal; su anchura hacia el quinto dientes igual o menor que la distancia de la punta del hocico al segundo diente maxilar. El número de escudetes dorsales es bastante variable y tienen quillas muy elevadas. La coloración varía conforme a la edad, en los animales viejos, la coloración dorsal es café olivo o verde olivo, muy brillante al contrario de los juveniles que es más clara, presentan flecos y manchas oscuras. La superficie ventral es blanca amarillenta con algunas manchas negras y a diferencia de *C. moreletii* la parte ventral no presenta escamas irregulares. Los

ojos son pequeños y de color verde azulado (Álvarez del Toro y Singler, 2001). Habita en las zonas tropicales, en aguas continentales, dulces y salobres e incluso en mar abierto, ya que tolera condiciones de salinidad variables sin problemas. Debido a que es capaz de osmoregular mediante una piel gruesa, riñones que eliminan detritos nitrogenados y glándulas en la lengua que excretan sales. Aunque esta especie se localiza principalmente en la costa, es ecológicamente adaptable. (Hernández *et al.*, 2006). Esta especie presenta cierto dimorfismo sexual, pues los machos suelen ser más grandes y alargados que las hembras, las masas musculares de la mandíbula son más abultadas en los machos y la joroba prefrontal es más exagerada. La hembra suele ser más gruesa y con la cola más corta y el hocico menos alargado (Álvarez del Toro y Singler, 2001).

### **2.8.3 *Caiman crocodylus chiapasus***

El caimán, también conocido como: Pululo, Talulín, Lagarto chato, lagarto de concha, se distribuye desde el sur de Oaxaca y Chiapas en México, hasta el Río Paraguay en América del sur. En México y Centroamérica se restringe a la zona costera del Pacífico. En América del Sur ocupa la costa del Atlántico y ciertas partes del interior del continente. Habitan en arroyuelos, ríos fangosos, lagunetas y esteros. En un principio esta especie fue de las menos explotadas debido a la dureza de su piel, sin embargo, al escasear los cocodrilos, los peleteros hallaron la manera de ablandar las pieles para su uso (Álvarez del Toro y Singler, 2001).

El caimán es una especie fácilmente identificable, lo corto y ancho de su hocico, así como una protuberancia dérmica en forma de cuernos sobre los párpados, lo hacen fácil de diferenciar de otras especies. A diferencia de los cocodrilos, el cuarto diente mandibular se oculta en una fosa del maxilar superior y no es visible cuando el hocico se cierra, solo es posible observar los dientes superiores o maxilares. La piel de estos animales es extremadamente dura, asimilando una concha, incluso en la parte ventral. Los escudos dorsales son planos y algunas filas latero dorsales tienen crestas o quillas. Su coloración va del amarillo ocre a pardo negruzco, con numerosas manchas negras. También presentan un característico color rosado en el interior de la boca. De los tres cocodrilianos mexicanos, este es el más pequeño alcanzando como talla máxima los 2.5 metros,



con un promedio de 1.2 m las hembras y 2.0 los machos (Hernández et al, 2006; Álvarez del Toro y Singler, 2001).

## **2.9 Situación actual para las tres especies distribuidas en México**

Las tres especies de cocodrilianos que se distribuyen en México están protegidas por las leyes y acuerdos nacionales e internacionales, a nivel internacional, por la Unión Internacional para la Conservación de la naturaleza de la Naturaleza (IUCN) y por la convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de flora y fauna silvestre (CITES) y a nivel nacional legalmente por la NOM-059-SEMARNAT-2010, en las cuales se menciona:

### **a) Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES)**

**Apéndice I:** En el Apéndice I se incluyen todas las especies en peligro de extinción. El comercio en especímenes de esas especies se autoriza solamente bajo circunstancias excepcionales.

**Apéndice II:** En el Apéndice II se incluyen especies que no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, pero cuyo comercio debe controlarse a fin de evitar una utilización incompatible con su supervivencia.

### **b) Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) Red List.**

**c) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010,** Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo (**NOM-059-SEMARNAT-2010**).

#### **2.9.1 *Crocodylus moreletii* (Duméril y Bibron, 1851)**

**CITES:** Apéndice I para todas las localidades donde se localiza, excepto las poblaciones de Belice y México que están incluidas en el apéndice II con un cupo nulo para los especímenes de vida silvestre.

**IUCN Red List:** Menor preocupación /Dependiente de conservación

**NOM-ECOL-059-SEMARNAT:** Sujeto a protección especial

### 2.9.2 *Crododylus acutus* (Cuvier, 1807)

**CITES:** Apéndice I para todas las localidades donde se localiza, excepto la población de Cuba que se encuentra incluida en el apéndice II.

**IUCN Red List:** Vulnerable

**NOM-ECOL-059-SEMARNAT:** Sujeto a protección especial

### 2.9.3 *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758)

**CITES:** Apéndice I

**IUCN Red List:** Bajo riesgo/ menor preocupación

**NOM-ECOL-059-SEMARNAT:** Sujeto a protección especial

## 2.10 Antecedentes

En México, se ha ido incrementando el interés por la producción y comercialización de la piel de cocodrilianos. El cocodrilo de pantano (*C. moreletii*), por las características de su piel, se ha colocado dentro de los estándares de calidad de pieles de cocodrilos con un alto valor comercial, sobre las otras dos especies distribuidas en México. Debido a esto, el INE (2000) implementó el programa de conservación y aprovechamiento de los cocodrilianos (CROMACOM) en México, que propone que la explotación de esta especie solo se realice en Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA). Es por esto, que diversos autores han centrado sus esfuerzos en generar información sobre las características de la especie y su reproducción en cautiverio para ayudar en la toma de decisiones para el establecimiento de las UMA.

Casas Andreu *et al.* (1995), presentaron un análisis de los cocodrilianos en México y su uso como recurso natural, donde resumen información relevante sobre las características de las tres especies de cocodrilianos en México, además de explotación y situación de sus poblaciones. Del mismo modo Álvarez del toro y Singler (2001) elaboraron un libro, que representa una de las publicaciones más importantes acerca de los Crocodylia en México, pues muestra un estudio puntual de las características morfológicas, fisiológicas y de comportamiento de las tres especies de cocodrilianos distribuidas en el país. Casas-Andreu *et al.* (2013), realizaron una sinopsis de datos biológicos y ecológicos del cocodrilo de pantano (*C.moreletii*), dando relevancia a hábitos alimenticios, comportamiento, morfología,

reproducción, estructura poblacional, preferencia de hábitat, crecimiento y conservación de la especie.

Cherkiss *et al.*, (2005), describieron algunos métodos de búsqueda y captura para cocodrilianos, con el fin de brindar bases para llevar a cabo conteos y/o captura de los organismos. Asimismo, mencionan que los métodos de captura a utilizar tienden a ser modificados según la especie de estudio o las condiciones en que se llevara a cabo el manejo.

Brandon Pliego (2007), estudió el tamaño y características de la población de *C. acutus*, en Jamiltepec, Oaxaca, los resultados obtenidos permitieron a este investigador agrupar a los organismos en tres clases de edad (juvenil, subadulto y adulto) de acuerdo a su talla. Asimismo, Platt *et al.* (2009), examinó datos morfométricos de 151 cocodrilos con el fin de desarrollar modelos de predicción, para establecer el tamaño corporal a partir de mediciones de atributos individuales. Indicando que se encontraron fuertes relaciones alométricas positivas entre las mediciones de longitud del cuerpo y otros atributos morfométricos, y por lo tanto proporcionan un medio confiable para estimar la longitud del cuerpo. Además, cuantifico el dimorfismo sexual indicando que los machos suelen ser un 20% más grandes que las hembras.

Serna-Lagunes *et al.* (2012) estudiaron la variabilidad morfológica y el crecimiento corporal de cuatro poblaciones de *C.moreletii* en la UMA el Cacahuatal, comparándolas con poblaciones de vida libre. Los resultados mostraron que las poblaciones provenientes de vida libre tuvieron un crecimiento corporal más acelerado que los nacidos en cautiverio. Lo que evidencia que algún aspecto del manejo en cautiverio probablemente esté afectando de manera negativa su crecimiento. Consecutivamente el mismo autor (Serna-Lagunes *et al.*, 2013) recopiló información sobre las características del aprovechamiento de *C.moreletii* en la UMA, Cacahuatal, ubicada en Veracruz, México, basándose en una entrevista semie-estructurada con preguntas abiertas, dirigidas al personal de la UMA. Por medio de estas entrevistas se obtuvo información detallada de la infraestructura de la UMA, características y manejo de la población, alimentación y comercialización.

### **2.11 Objetivo.**

Describir las características morfométricas de los organismos muestreados.

### **2.12 Metodología**

Cuando se pretende manipular un cocodrilo, se debe tomar en cuenta el riesgo que esta actividad puede representar tanto para el manejador como para el animal. La captura y manipulación de los organismos requiere experiencia, conocimiento, práctica, habilidad y paciencia. Por lo tanto, esta actividad debe realizarse con sumo cuidado, de la forma más apropiada y tomando en cuenta todo aquello que podría acontecer en el transcurso de la manipulación, con el fin de evitar cualquier tipo de accidente (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011). El tipo de manipulación a realizar, dependerá del objetivo de la misma (limpieza de los encierros, traslado, reubicación, exploración clínica, toma de datos morfométricos, evaluación, alimentación forzada, entre otras (Balderas *et al.*, 2014; Cherkiss *et al.*, 2005). Para esta investigación el fin de la manipulación fue: la toma de datos morfométricos y la obtención de muestras de tejido y/o sangre, dependiendo esto de las condiciones disponibles. Los datos y muestras necesarias se obtuvieron en un solo manejo. Para la manipulación de los organismos, se tomó en cuenta las condiciones de los encierros en las que estos se encontraban confinados y el tamaño de los mismos. La manipulación se realizó de manera rápida y eficaz evitando el estrés innecesario de los animales. Así mismo se tomaron las medidas necesarias para garantizar la seguridad tanto del animal como del o de los manejadores.

#### **2.12.1 Manipulación de organismos**

Para la manipulación de los organismos, estos se clasificaron por tamaño (en intervalos de 50 cm), clase y etapa (cuadro 1). A partir de esta clasificación se definió el método a utilizar para su contención.

**Cuadro 2. Clasificación de los organismos y asignación de una etapa y clase con base en su tamaño. Tomado de Sánchez, 2001.**

<b>Etapa</b>	<b>Talla (cm)</b>
<b>Cría</b>	<b>25- 50 cm</b>
<b>Juvenil</b>	<b>51-100 cm</b>
<b>Sub- adulto</b>	<b>100-150 cm</b>
<b>Adulto</b>	<b>150-200 cm</b>
<b>Adulto Grande</b>	<b>➤ 200 cm</b>

Los animales clasificados de esta manera se manipularon de la forma siguiente:

#### **Manipulación de crías y organismos juveniles**

Para la captura de los organismos denominados como juveniles, la forma más práctica, es acercarse con seguridad por la parte posterior del animal, en un solo movimiento sujetar el cuello del animal con una mano y, en seguida, con la otra mano sujetar la cola del mismo, evitando así que este pueda girar (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011). Posterior a esto, el manejador coloca una liga para asegurar el hocico del animal, para el manejo de estos ejemplares, la inmovilización con cuerdas no es necesaria, evitando así un mayor estrés para el animal.

#### **Manipulación de organismos Sub-adultos.**

La captura de estos cocodrilos se llevó a cabo por medio de cuerdas y pértigas de diferentes tamaños, en este caso el manejador debe acercarse suficiente al animal hasta donde lo permitía la pértiga o la cuerda según sea el caso, colocándola alrededor del cuello del mismo y jalando la línea con fuerza en un rápido movimiento para asegurar al animal, al comenzar este a girar se libera un poco de cuerda para mantener una distancia adecuada, evitando así cualquier contacto con la mandíbula. Una vez que se tiene sujetado al animal, una persona de apoyo aplica mayor tensión con el cable mientras que el manejador sujeta la cola del animal, aplicando tensión para evitar de esta manera que el animal gire. Enseguida se coloca una mano en la base de la cola y la otra en el cuello con suficiente fuerza para contenerlo, una vez hecho esto, las rodillas se colocan

alrededor del animal, sujetando el cuello con ambas manos, una vez asegurado el cuello, se realizan movimientos cortos con las manos hacia el frente para sostener la mandíbula, levantándola en un ángulo de 45°. Posterior a esto, la persona que sostiene el cable de la pértiga puede dejar de hacer tensión, para tapar los ojos con cinta adhesiva y asegurar la mandíbula del animal. Por último, cuando es necesario se sujetan las patas traseras y delanteras con un cordón de una manera segura y cómoda para el ejemplar, asegurándose de no interrumpir el flujo sanguíneo (Balderas *et al.*, 2014).

### **Manipulación de Adultos y adultos grandes (reproductores).**

Para el caso de cocodrilos de tallas Mayores a los 1.50 cm, fue necesario utilizar diferentes tipos de cuerdas con distintas longitudes, diámetros y resistencia. El manejo fue realizado por al menos dos personas, cuando fue posible se contó con el apoyo de más de una persona. El método a seguir consistía en pasar una cuerda alrededor del cuello, ya sea con ayuda de una pértiga o lazando al animal, en algunas ocasiones el animal tiende a reaccionar al contacto con la cuerda, haciendo movimientos bruscos con la cabeza, quedando solamente sujeta la parte superior o inferior de la mandíbula, en este caso, rápidamente se pasaba una cuerda por en medio de aquella que sujetaba la mandíbula, con el fin de asegurar el cuello del animal. Una vez que se tenía al animal por el cuello, se aseguraba la mandíbula a distancia con la misma cuerda y hacia tensión colocando otra cuerda aproximadamente a una tercera parte de la cola, en animales denominados adultos grandes, generalmente se utilizaban tres cuerdas. Ya que se tenía sujeto al animal, se colocaba un trapo húmedo sobre los ojos del mismo, para disminuir un poco el estrés que pudiese causarle el observar el procedimiento a realizar. Paso siguiente se procedió con la llamada “monta” a la porción sacra desplazándose hacia adelante hasta el cuello, sujetando los miembros anteriores hacia la región caudal, primero con las manos y después apoyándose con las piernas, al tiempo que otra persona sujetaba los miembros posteriores para quitarle apoyo y evitar que pudiese girar. Enseguida se realizaron movimientos cortos hacia adelante al cuello y hasta la mandíbula, la cual se iba sujetando fuertemente desde la base hasta aproximadamente la mitad o hasta donde se

sintiera que estaría bien asegurada, después se levanta en un ángulo de 45° , la persona que sujetaba la cola procedía a “montarse” sobre la base de la misma, quien hacia tensión con la primera cuerda se ocupaba de colocar una liga de hule alrededor de la mandíbula y asegurar el trapo húmedo que anteriormente había sido colocado sobre los ojos. Ya controlada la mandíbula se sujetaban los miembros posteriores y anteriores tensándolos sobre el dorso del cuerpo de una manera segura y cómoda para el ejemplar, asegurándose de no interrumpir el flujo sanguíneo (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011, Balderas *et al.*, 2014).

### 2.12.2 Toma de datos.

La toma de datos morfométricos permite determinar la estructura de la población y llevar un registro del crecimiento y morfología los organismos. En el caso de las medidas craneales, estas fueron registradas con ayuda de un Vernier siempre que las condiciones lo permitieron, para las medidas restantes y organismos de mayor tamaño se utilizó una cinta métrica flexible. Las mediciones fueron realizadas por una misma persona para disminuir el porcentaje de error.

#### **Medidas corporales básicas**

(Estas medidas nos dan un dato exacto de las dimensiones generales del cuerpo y se tomaron con el organismo en posición. por la parte ventral del mismo).

- 1.- **Longitud total (LT)**, desde la punta del hocico hasta la punta de la cola.
- 2.- **Longitud hocico cloaca (LHC)**, desde la punta del hocico hasta donde inicia la cloaca.
- 3.- **Perímetro de la base de la cola (AC)**, Se mide a la altura de la tercera línea transversal de escamas caudales, posterior a la pelvis. Esta medida tiene relación con la condición corporal del animal.

#### **Medidas craneales**

(Estas medidas nos indican el tamaño de la estructura craneal, importante en la identificación de las especies y se obtienen con el animal boca abajo).

- 1.- **Longitud total del cráneo (LTC)**, desde la punta del hocico hasta el borde posterior del hueso supraoccipital.

**2.- Ancho del Cráneo 1 (AC 1)**, se mide la parte más ancha del cráneo, entre los extremos de los huesos cuadrados.

**3.- Ancho del cráneo 2 (AC 2)**, se mide la distancia entre las protuberancias maxilares.

**4.- Ancho del cráneo 3 (AC 3)**, se mide la anchura entre las protuberancias premaxilares.

#### **Peso de los ejemplares**

Para determinar el peso de los organismos, se contó con básculas o pesolas de diferentes capacidades. Los organismos fueron pesados de acuerdo a lo que las condiciones permitían, dependiendo del tamaño de los mismos y el personal de apoyo con el que se contaba. El que un animal fuera pesado o no dependía en gran parte del tamaño de este, pues si bien, para organismos juveniles bastaba con un cordón atado en forma de pechera, para organismo adultos se requería de un amarre circular, basculas de mayor capacidad y personal de apoyo para llevar a cabo este procedimiento.

#### **Sexado de los ejemplares**

Para determinar el sexo de los cocodrilos se utilizaron dos métodos, la evaginación del pene y el tacto cloacal, el uso de uno u otro método dependía del tamaño del organismo. Debido al contacto directo que se tiene con la cavidad cloacal, el uso de guantes fue indispensable para protección tanto del manejador como de los animales.

##### **a) Evaginación del pene**

Este método fue utilizado para algunos de los organismos juveniles, en los cuales el tacto cloacal podría representar algún riesgo para el animal debido a su tamaño. Para llevar a cabo la evaginación del pene, se debía colocar al cocodrilo en posición natural sobre una superficie plana, a continuación, se flexiona la cola hacia arriba, ejerciendo presión en la parte inferior de la cloaca con unas pinzas de disección o en su defecto con los dedos pulgar e índice, haciendo esto el pene sobresalía si se trataba de un macho, (Chabreck, 1963, INE, 2000, Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).



## **b) Tacto cloacal**

Para los organismos de mayor tamaño, el sexo se determinó por medio de tacto cloacal, el cual este consiste en insertar el dedo índice en la cloaca moviéndolo suavemente a través de la cavidad y a lo largo del piso ventral con dirección hacia los miembros anteriores. Si el animal era macho, se sentiría una protuberancia dentro de la cavidad (Chabreck, 1963, INE, 2000, Álvarez del Toro y Singler, 2001, Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).

## **Liberación del cocodrilo**

Una vez que se cumplió el objetivo por el cual fue manipulado el cocodrilo, este debía ser liberado. Soltar las ataduras y liberar al animal son los aspectos en los que debe tener tanto cuidado y precaución como para contenerlos, pues suele ser un tanto más riesgoso, si no se tiene el cuidado apropiado (Cherkiss *et al.*, 2005). Para liberar al organismo, se tomaron las precauciones necesarias para evitar cualquier accidente, para el caso de los organismos juveniles, estos solo tenían que ser sujetados del cuerpo con una mano y de la mandíbula con la otra, retirando la liga con la cual fue asegurada la mandíbula. Finalmente se regresaban al encierro al que pertenecían. Cuando se trataba de liberar organismos de mayor tamaño, era necesario realizar nuevamente la “monta” para asegurar la mandíbula con las manos, levantándola en un ángulo de 45°. Cuando era requerido, una persona de apoyo montaba el cocodrilo por la parte dorsal caudal levantando la cola en un ángulo de 90° y sujetándola con fuerza. Una tercera persona liberaba los miembros anteriores y posteriores del animal y se encargaba de colocar una cuerda entre la piel del animal y la liga que mantenía cerrada la mandíbula, sujetándola con un fuerte nudo, esto con el objetivo de poder retirar la liga a una distancia segura para el manejador. Por último, se desmontaba al animal dejando una rodilla sobre el mismo solamente como apoyo y con un movimiento rápido se soltaba al animal hacia el frente al tiempo que se daba un paso hacia atrás, retirándose rápidamente al lado contrario de donde se encuentra la mandíbula, finalmente solo se hala con fuerza la cuerda que sostiene la liga para zafarla y dejar libre la mandíbula del cocodrilo.

### 2.13 Resultados y Discusión

En total se manipularon 82 organismos para las tres UMA, la estructura de la población se determinó individualmente para cada UMA, para esto, se obtuvo el tamaño poblacional censal, se determinó el sexo de cada individuo cuantificando el número de hembras y el número de machos y se clasificó a los organismos con base en su LT, asignándoles una etapa de crecimiento conforme a lo descrito en la metodología. La proporción hembras y machos fue diferente para cada una de las UMA, en la UMA colorada se obtuvo un total de 22 muestras de las cuales, cuatro fueron hembras, dos en etapa sub-adulta, una adulta y una adulta grande. En cuanto a los machos estos sobrepasaron por mucho la cantidad de hembras con 18 organismos de los cuales, 12 eran adultos y seis eran adultos grandes. Para la población de San Fernando se obtuvieron 30 muestras, donde 29 resultaron ser hembras en etapa juvenil y solo hubo un macho también en etapa juvenil. Por último, el CICEA tuvo un total de 30 individuos, 19 de estas eran hembras, siete de las cuales se clasificaron como sub adultas y 12 adultas. Los machos representados por 11 individuos, se dividieron en tres sub adultos, siete adultos y un adulto grande (Figura1 y 2).

Es necesario llevar un registro de la morfología de los organismos criados en cautiverio, pues una disminución de la variación genética puede deteriorar los procesos de adaptación e incluso alterar los caracteres morfológicos dentro de las poblaciones, (Serna-Lagunes *et al.*, 2012; Flint *et al.*, 2000). Para las tres UMA muestreadas no se encontraron anomalías en la morfología de los organismos más allá de heridas ocasionadas por peleas o accidentes comunes ocasionados por el mismo aislamiento. La descripción morfológica se basó en la descrita por Álvarez del toro y Singler (2001), Sanchez Herrera *et al.* 2011 y Casas-Andreu *et al.* 2013. En cuanto a la coloración, esta estuvo dentro de las tonalidades descritas por Álvarez del toro y Singler (2001), quienes mencionan que *C. moreletii* presenta dos variantes principales: una decididamente oscura y otra notablemente amarillenta. Además, de una parda que prácticamente carece del jaspeado amarillo tan típico de la especie.

Figura 1. Proporción de hembras y machos para cada una de las 3 UMA muestreadas, las barras en color verde muestran el número de machos y las barras en color azul el número de hembras.

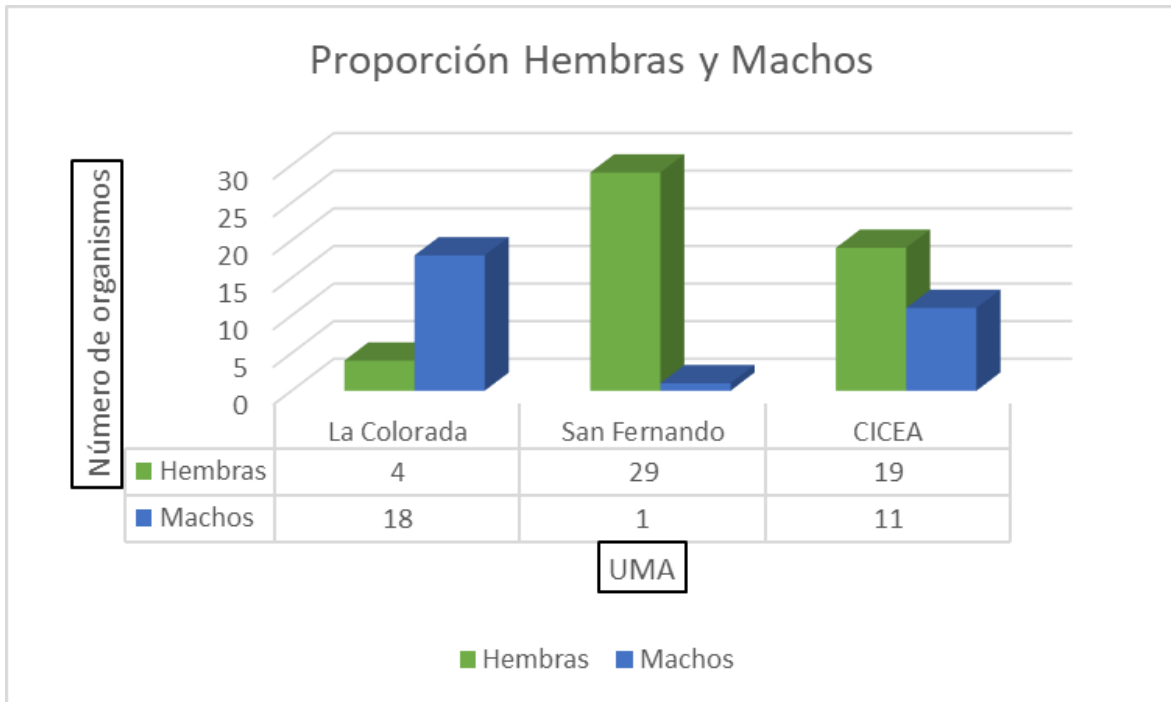
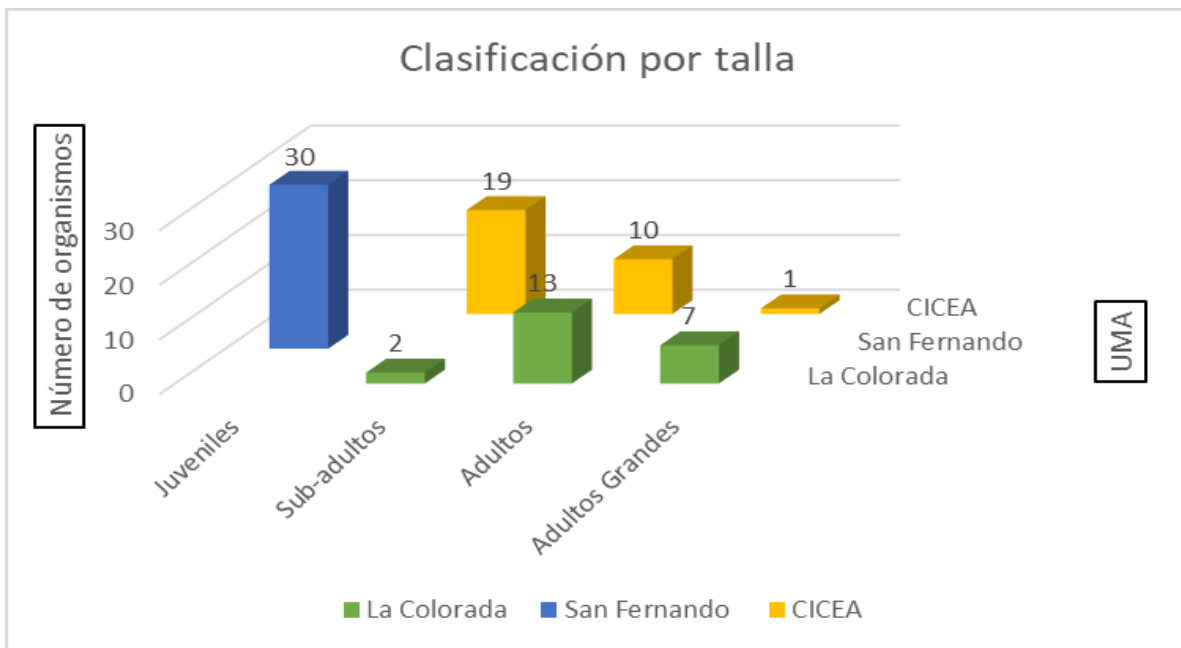


Figura 2. Muestra la clasificación con base en el tamaño de los organismos, cada color identifica una UMA, el color verde para La Colorada, el color azul para San Fernando y el color amarillo para el CICEA.



## **2.14 Conclusiones**

Considerando los valores morfométricos obtenidos, no se encontró evidencia de cambios morfológicos en la población (trastornos genéticos), los individuos se encontraban dentro de los parámetros descritos para cada categoría en esta especie.

## 2.15 Literatura citada

- Aguilar-Miguel, X. 2005. *Crocodylus moreletii*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY- NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
- Álvarez del Toro, M. y L. Singler. 2001. Los Crocodylia de México 1ª Edición. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C. México, PROFEPA. 134 p.
- Balderas, S. A., L.G. Israel, B.V. Diana. 2014. Estudio Tipo Anexo Cría en Cautiverio *Crocodylus moreletii*. SEMARNAT-DGVS. Mexico. 43pp.
- Brandon-Pliego, J.D. 2007. Estudio poblacional de *Crocodylus acutus* (Cuvier 1807), (Reptilia: Crocodylia) en Jamiltepec, Oaxaca. *Ciencia y Mar*, XI (33):29-37.
- Casas-Andreu, G. 1995. Los cocodrilos de México como recurso natural. Presente, Pasado y Futuro. Instituto de Biología, UNAM. 9pp.
- Casas-Andreu, G. y G. Barrios. 2003. Hábitos alimenticios de *Crocodylus acutus* (Reptilia: Crocodylidae) determinados por el análisis de sus excretas en la costa de Jalisco, México. Casas-Andreu, G., G. Barrios-Quiroz y R. Macip-Ríos. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Rev. Mex. de Biodiv.* 82:261-273.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios y R. Macip. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Rev. Mex. Biodiv.* Vol. 82 No. 1 México.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios, A. Escobedo-Galván y X. Aguilar-Miguel. 2013. Sinopsis de datos biológicos y ecológicos del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México. pp: 63.
- Cedeño-Vázquez, J.R., J. Ross y S. Calme. 2006. Population status and distribution of *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in southeastern Quintana Roo, Mexico. *Herp. Nat.Hist.* 10 (1):53-66.
- Cedillo-Leal, C., J.C. Martínez-González, F. Briones-Encina y E. Cienfuegos-Rivas. 2011. Importancia del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en los humedales costeros de Tamaulipas, México. *Cienc. Uat.* 21(3):18-23.
- Chabreck, H. R. 1963 Methods of capturing, marking and sexing alligators. Louisiana Wild Life and Fisheries Commission. Grand Chenier, Louisiana. Seventeenth Annual Conference Southeastern Association of Game and Fish Commissioners.
- Cherkiss, M., H. E. Fling, F. J. Mazzotti, K. G. Rice y M. D. Conill. 2005. Contando y capturando cocodrilos. CIR1451S, University of Florida IFAS Extension, Wildlife Ecology and Conservation Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 12 pp.
- CITES. 2010. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres, 31pp.

- Escobedo G. A. 2003. Periodos de actividad y efecto de las variables ambientales en cocodrilos (*Crocodylus acutus* Cuvier 1807): Evaluando los métodos de determinación de la fracción visible. *Ecol. Aplic.* Vol. 2(1).
- Escobedo-Galván, A.H. 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.
- Flint, N.S., F.H. Van der Bank y J.P. Grobler. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA* Vol. 26 (1): 105-110.
- Fontanilla-Pérez, J.C., C. García-Artiga e I. Gaspe-Simón. 2000. Los reptiles: Biología, Comportamiento y Patología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México, 160pp.
- García-Grajales, J., A. Buenrostro-Silva y P.R. Téllez-Rodríguez. 2009. Variación de patrón de escutelación nucal del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus* Cuvier 1807) en La Ventanilla, Oaxaca, México. *Act. Zool. Mex. México.* Vol. 25(2): 375-382
- Gordillo-Chávez, J.E. 2013. Evaluación de la UMA de cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Licenciatura en Biología. 53pp.
- Hernández, H., R. García-de Quevedo y P.S. Hernández. 2006. Los cocodrilos de la costa del pacífico occidental (Michoacán, Colima y Jalisco) de México. En *Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán*. Instituto Nacional de Pesca. 1ra Ed. 375-389.
- INE. 2000. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Crocodylia de México (COMACROM). Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Marina y Recursos Naturales, Distrito Federal, México.
- IUCN, 2010. Red List of Threatened Species, Version 2010.2. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources ( <http://www.iucnredlist.org>).
- NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Platt, S.G., T.R. Rainwater, J.B. Thorbjarnarson, A.G. Finger, T.A. Anderson, & S.T. McMurry. 2009. Size estimation, morphometrics, sex ratio, sexual size dimorphism, and biomass of Morelet's crocodile in northern Belize. *Caribb. J. Sci.* 45, 1–14.
- Platt, S.G., L. Singler y T.R. Rainwater. 2010. Morelet's Crocodile *Crocodylus moreletii*. En: S.C. Manolis y C. Stevnsen (eds). *Crocodyles: Status Survey and Conservation Action Plan*, 3<sup>rd</sup> Edition, Crocodile Specialist Group: Darwin. Pp. 79-83.
- Rodríguez, M.M.A. 2000. Cocodrilos (Archosauria: Crocodylia) de la Región Neotropical. *Biota Colombiana.* 1(2):135-140.

- Rodríguez, D., J.R. Cedeño-Vázquez M.R.J. Forstner, L.D. Densmore. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: II. Evidence from microsatellites. J. Exp. Zoo. 309A:674–686.
- Ross, J. P. 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2<sup>nd</sup> Edition. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK pp: 96
- Sanchez, J. 2001. Estado de la población de cocodrilos (*Crocodylus acutus*) en el río Tempisque Guanacaste Costa Rica. Informe Final. Área de Conservación Tempisque. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica, 49 pp.
- Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajauregui, A. García-Naranjo y H. Benítez-Díaz. 2011. Programa de monitoreo del Cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). México, Belice, Guatemala. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 270 pp.
- Serna-Lagunes, R. 2010. Historia de vida y genética cuantitativa de cuatro poblaciones de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) bajo condiciones de cautiverio en el trópico mexicano. Maestría en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados. México Veracruz. 111 pp.
- Serna-Lagunes, R., D. González y P. Díaz-Rivera. 2012. Variabilidad genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae) mediante el uso de marcadores microsatelitales. Rev. Biol. Trop. Vol. 60 (1): 425-436.
- Serna-Lagunes, R., L.A Téllez, S.L.J. Cervantes, J.M. Cota, 2013. Manejo integral del cocodrilo de pantano, *Crocodylus moreletii*: esquema técnico para su aprovechamiento en cautiverio. Rev. Agro. Marzo 2013: 38-40.
- Young J.Z. 1980. La vida de los vertebrados. Barcelona. Ediciones Omega. 3er. Ed. 660 pp.

## CAPÍTULO 3. VARIACIÓN GENÉTICA EN TRES UMA DE MÉXICO

### 3.1 Resumen

La reproducción en cautiverio ha demostrado ser un factor determinante para estrategias de manejo y conservación en las diferentes especies de cocodrilos, en México el aprovechamiento *ex-situ* de los cocodrilianos se da por medio de las UMA. Estas han arrojado resultados positivos en cuanto al número de organismos que ahí se reproducen, sin embargo, la alteración de la composición genética es común que en la UMA de tipo intensivo. El objetivo de esta investigación es Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de cocodrilos alojadas en tres UMA establecidas en el territorio Nacional, con el fin de establecer bases para programas que aseguren la viabilidad a largo plazo. Se obtuvieron muestras de 82 organismos en tres UMA, a las cuales se les extrajo el ADN y se amplificaron utilizando siete microsátélites del genero *Crocodylus*, los productos fueron enviados para su estudio en un analizador de fragmentos. El análisis de microsátélites mostró que todos los loci eran altamente polimórficos con un porcentaje del 100%. Se detectaron un total de 43 alelos para el total de la población. El número de alelos varió entre tres y 12, con un promedio de 6.14 alelos por locus para el total de la población, los valores obtenidos para la  $H_o$  fueron mayores a los de la  $H_e$ , indicando con esto un exceso de heterocigotos para las tres poblaciones. El análisis de la estructura de la población muestra que las tres poblaciones son muy parecidas lo que podría ser indicio de una adaptación al cautiverio.

Palabras Clave: Variación genética, estructura poblacional, cocodrilidos, microsátélites, UMA.



### 3.2 Introducción

Como respuesta a la disminución de las poblaciones de cocodrilos, en algunos países surgieron diferentes programas de conservación, los cuales han ido variando considerablemente desde sus inicios; entre estos programas, la reproducción en cautiverio ha demostrado ser un factor determinante, funcionando como base en estrategias de manejo y conservación de las diferentes especies de cocodrilos (Casas-Andreu *et al.*, 2011).

Desafortunadamente, en México la falta de una regulación específica para el comercio de la piel de cocodrilo, permitió durante muchos años una explotación excesiva del recurso, la cual trajo consigo una drástica disminución de las poblaciones de cocodrilos, ocasionando que estos animales llegaran a estar en una situación de alto riesgo de desaparecer del medio silvestre (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011). Aunado a esto y contrariamente a sus objetivos de protección y conservación, el establecimiento de las vedas fortaleció las cadenas de aprovechamiento ilegal de estas especies, siendo los antiguos beneficiarios del uso legal del recurso los que vieron afectados sus intereses. Por tal motivo esta prohibición motivó a los interesados a solicitar nuevamente permisos de aprovechamiento a la Federación. Promoviendo el establecimiento de criaderos intensivos con fines comerciales y de conservación (INE, 2000). De esta manera iniciaron distintos programas de conservación y reproducción de cocodrilos en varios estados de la República Mexicana (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011), de tal manera que la crianza de cocodrilos en cautiverio en el país surgió con fines comerciales, como respuesta a la veda establecida por el Gobierno Federal en 1970 (Casas-Andreu, 1995). Por lo que, esta industria está basada esencialmente en la reproducción y cría de cocodrilos en cautiverio, cuya finalidad primordial es el comercio de su piel, carne y otros derivados de estos organismos (Serna-Lagunes, 2010).

### 3.3 Aprovechamiento en cautiverio

A diferencia de otras especies, los cocodrilos tienen una buena adaptación al cautiverio, siendo capaces de soportar programas de conservación y manejo basados en un aprovechamiento económico, de tal manera que permiten integrar la investigación y el manejo de las poblaciones (Escobedo-Galván, 2004).

De las 23 especies que se distribuyen alrededor del mundo (Ross, 1998), tres de estas se pueden encontrar en las regiones tropicales de México, el *Crocodylus acutus* (cocodrilo de río), el *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) y el *Caiman crocodylus chiapasius* (caimán) (Álvarez del Toro y Singler, 2001; Casas-Andeu *et al.*, 2103). Las tres especies de cocodrilianos mexicanos son susceptibles de cría intensiva, sin embargo, se debe considerar que el caimán debido a la dureza de su piel es el menos indicado para fines comerciales. El cocodrilo de río proporciona una piel muy buena, pero la región dorsal es difícil de aprovechar, debido a que está cubierta por escudetes osificados. Finalmente, el cocodrilo de pantano es la especie más adecuada para la cría en cautiverio, debido a características como: velocidad de crecimiento, talla y madurez sexual. Sin mencionar que la piel de estos organismos presenta escudetes más regulares que la otra especie, los escudos dorsales son bastante planos y la piel es delgada para un cocodriliano, lo que permite un aprovechamiento íntegro de la misma (Álvarez del Toro y Singler, 2001).

Actualmente, el aprovechamiento *ex-situ* de los cocodrilianos en México se da por medio de las Unidades de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) y la especie de cocodrilo que ha sido utilizada para la cría intensiva, es el Cocodrilo de Pantano (*C. moreletii*), debido a su facilidad de adaptación al cautiverio, características morfológicas y velocidad de crecimiento siendo introducido en algunas localidades fuera de su rango natural de distribución, como en los estados de Sinaloa y Colima con fines comerciales (INE, 2000; Gordillo Chávez, 2013).

### **3.4 Las Unidades de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA)**

La Ley General de Vida Silvestre (LGVS) y su reglamento son los principales instrumentos que se utilizan para regular el aprovechamiento de la vida silvestre; a través de la autorización correspondiente por parte de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), que se encarga de otorgar, con base en criterios estrictamente delimitados, los permisos y autorizaciones correspondientes así como la supervisión, fin de que dicho aprovechamiento no afecte las poblaciones o el hábitat de las especies involucradas, si no que contribuya a al propósito básico de su conservación (SEMARNAT, 2009). La LGVS plantea dos categorías para el Manejo de Fauna Silvestre: manejo extensivo, que, por medio de la conservación y el manejo del hábitat, busca favorecer las condiciones para la reproducción de especies interés con fines de aprovechamiento y conservar aquellas que poseen valor de uso, así como las comunidades y ecosistemas a los que se encuentran asociadas. De este modo, es posible mantener la riqueza genética y taxonómica en diversos ecosistemas de México, permitiendo el aprovechamiento cinegético de estos recursos, siendo uno de los esquemas productivos mejor organizados actualmente en el país. Por otra parte, el manejo intensivo se lleva a cabo en estricto confinamiento y promueve la reproducción de especies mediante manipulación zootécnica directa.

El organismo creado para llevar a cabo un correcto manejo de la Vida Silvestre son las llamadas Unidades de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre, denominadas por sus siglas UMA (Unidades de Manejo y Aprovechamiento). De esta manera la LGVS establece que solo a través de las UMA se permite el aprovechamiento de ejemplares, partes y derivados de vida silvestre (SEMARNAT, 2009). Las UMA se definen como unidades de producción o exhibición en un área delimitada claramente bajo cualquier régimen de propiedad (privada, ejidal, comunal, federal, etc.), donde se permite el aprovechamiento de ejemplares, productos y subproductos de los recursos de la vida silvestre. Para su funcionamiento las UMA deben operar bajo un plan de manejo previamente aprobado y autorizado por la SEMARNAT, el cual funge

como un documento técnico operativo que describe y programa las actividades para el manejo de las especies y sus hábitats, garantizando la conservación de los ecosistemas, sus elementos y la viabilidad y permanencia de las poblaciones que ahí se encuentren. (SEMARNAT, 2009; SEMARNAT, 2013).

#### **3.4.1 Tipos de UMA**

De acuerdo con la LGVS las UMA pueden ser intensivas o extensivas y en algunos casos mixtas, esto dependerá de los objetivos y la especie o especies que ahí se manejen. En las UMA de carácter intensivo el manejo de los organismos es en confinamiento y en condiciones controladas con intervención directa del hombre, estas permiten el uso y comercialización de ejemplares y sus derivados además de fomentar pláticas de educación ambiental al público en general, instituciones públicas y privadas. En las UMA extensivas, el manejo es de tipo no extractivo y los ejemplares se encuentran en vida libre, las prácticas de conservación y mejora se efectúan en el medio donde se encuentran éstos (SEMARNAT, 2013), permitiendo actividades de ecoturismo y educación ambiental, enfocándose primordialmente en la recuperación, investigación y exhibición de la especie (Cedillo-Leal *et al.*, 2011).

#### **3.4.2 Creación de las UMA**

Las UMA no existían en nuestro país antes de la última década del siglo pasado, cuando la DGVS de la entonces Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), dio lugar a la creación de la figura de la UMA, creada como un instrumento que integrara estrategias ambientales, económicas, sociales y legales enfocadas a la vida silvestre, con el propósito de conservar la riqueza natural y a su vez crear incentivos económicos realistas para su correcto manejo. Antes de su creación se habían probado otros esquemas de aprovechamiento con resultados cuestionables. En 1997 la SEMARNAP puso en marcha el Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural 1997-2000, como parte de esa iniciativa se consideró la creación de un Sistema de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (SUMA), concibiendo a las Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) como espacios

para promover esquemas alternativos de producción compatibles con el cuidado del ambiente y el uso racional ordenado y planificado de los recursos naturales en ellas contenidos, con el propósito de frenar o revertir los procesos de deterioro ambiental. De este modo las UMA nacieron el 5 de junio de 2000 en el Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) de Hampolol, Campeche, con la presentación de la Estrategia Nacional para la Vida Silvestre (Gallina-Tessaro *et al.*, 2009; Robles-de Benito, 2009).

Las primeras UMA se establecieron antes de la publicación de la Ley de Vida Silvestre (1997), y se han ido transformando en herramientas muy útiles para la conservación, por su versatilidad, su capacidad de generar riqueza a través del aprovechamiento sustentable del patrimonio natural. Sin embargo, se han realizado muy pocas evaluaciones para conocer el impacto que han tenido sobre la conservación de la vida silvestre. Estas carencias impiden evaluar el desempeño real de las UMA y determinar cuál es su impacto real sobre la conservación de la biodiversidad del país. Pues si bien las UMA deben ser empresas redituables desde el punto de vista económico, no se debe dejar de lado la conservación de los recursos naturales de los cuales depende su funcionamiento (Gallina-Tessaro *et al.*, 2009).

### **3.5 Problemática**

A la fecha, los programas de crianza de *C. moreletii* en las UMA han arrojado resultados satisfactorios, ya que mantienen altos números de organismos para su comercialización; sin embargo, estos resultados podrían estar enmascarando una disminución significativa de la variación genética, así como el tamaño de la población efectiva, aumentando la endogamia en las poblaciones, pues una gran disminución de las poblaciones como sucedió con los cocodrilianos, trae consigo, la pérdida de la diversidad genética. Además, es común que, en las UMA de aprovechamiento intensivo, las poblaciones iniciales sean pequeñas, los apareamientos se lleven a cabo sin aleatoriedad y el comportamiento dominante de los machos se incremente, por lo que no todos los individuos estarán representados genéticamente en la población, alterando los patrones de flujo génico y disminuyendo los niveles de variabilidad genética. Por lo tanto, es

importante evaluar la estructura de la población a nivel genético para el manejo adecuado de las poblaciones *ex-situ*, ya que una nula o inadecuada valoración de las estas podría ocultar un deterioro o disminución en su variabilidad genética, con lo cual la deriva génica puede jugar un papel importante para incrementar la endogamia, al tener menos individuos heterocigotos, afectando la viabilidad de las mismas a largo plazo, modificando así su capacidad de respuesta y adaptación, afectando a nivel individual la supervivencia de los organismos (Álvarez-Romero *et al.*, 2008, Flint *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2009; Serna-Lagunes *et al.*, 2012).

Un monitoreo a nivel genético es importante tanto en poblaciones silvestres como en cautiverio, pues es necesario contar con información adecuada de los sucesos que ocurren al interior de las mismas, ya que eventos como los cuellos de botella, podrían pasar desapercibidos aun cuando la población mantiene un gran número de organismos. Si una proporción sustancial de una población no está reproduciéndose, la población puede ser vulnerable a las fluctuaciones ocasionales a pesar de aparentes grandes números. Una falla en el reclutamiento podría resultar devastadora si uno de estos individuos exitosos también fuera infértil. A largo plazo la persistencia de la población depende, en parte, del mantenimiento del potencial evolutivo que a su vez requiere variación genética (Luikart *et al.*, 1998). La UICN aun reconoce tamaños poblaciones censales, cuando debería enfocarse en los tamaños poblacionales efectivos, siendo esto lo más adecuado para saber el estado de la población (Eguiarte *et al.*, 2007)

En las poblaciones cautivas el número de reproductores efectivos tiene a ser muy reducido, siendo este un factor que incrementa la tasa de pérdida de heterocigosis dando como resultado que con cada reproducción se tengan generaciones con menor variación genética, al incrementar la incidencia de copias de alelos que suelen ser idénticos por descendencia (Serna-Lagunes y Díaz-Rivera, 2011).

### **3.6 Variación Genética**

En poblaciones grandes existe poca carga genética, debido a la eficacia de la selección natural, la mayoría de las variantes perjudiciales son recesivas y ocurren en una baja frecuencia. Sin embargo, las poblaciones de algunas especies en peligro de extinción han disminuido tanto su tamaño que han perdido variación

genética y poseen una alta frecuencia de alelos deletéreos, incluso llegando a fijar estos alelos en la población. De tal manera que, cuando las poblaciones son pequeñas y demográficamente inestables: aquellos *loci* que son perjudiciales podrían fijarse en la población (Hedrick, 2001), reduciendo la adecuación y generando una retroalimentación negativa, lo que refuerza el decline, aumenta la depresión por endogamia y la susceptibilidad a eventos estocásticos reduciendo aún más el tamaño poblacional (Eguiarte *et al.*,2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la variación en la información genética permite a las especies mantener su adaptación a las diversas situaciones que se presentan a lo largo de su historia y son parte fundamental en su evolución (Mace y Purvis, 2008). Estas variaciones en la información genética pueden ser de naturaleza neutra, perjudicial o adaptativa, esto dependerá del medio ambiente, el tamaño de la población etc. Por ejemplo, si un alelo particular es adaptativo, como la resistencia a una enfermedad infecciosa en determinado medio ambiente, este podría volverse perjudicial cuando el patógeno está ausente debido a un costo pleotrópico asociado al alelo. Alternativamente, Variantes que son neutrales en una determinada situación podría resultar adaptativo en otra. La variación adaptativa es crucial para la supervivencia de las especies a largo plazo, dado que las poblaciones se enfrentan a continuos cambios ambientales, enfermedades, especies introducidas, modificaciones en su entorno etc. (Hedrick, 2001).

### **3.7 Polimorfismos Genéticos**

Desde el punto de vista molecular, las variaciones en la información genética, son denominadas polimorfismos, estos derivan de cambios espontáneos en el ADN (mutaciones). Estos polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también, pueden contribuir a causar enfermedades. Un polimorfismo se caracteriza por que cada individuo presenta diferencias en el número variable de veces, de una secuencia corta, en una posición concreta del genoma, al cual se le denomina locus y cada posible variante es interpretada como un alelo. A este par de alelos en un individuo se le llama genotipo, si este par de alelos son idénticos para un individuo se determina que es homocigoto para ese locus en particular, en

cambio si los alelos son diferentes para un mismo locus será heterocigoto. Cada individuo es portador de dos alelos, uno en cada copia del cromosoma, estos son transmitidos a la descendencia, uno por la madre y el otro por el padre de manera independiente, adquiriendo cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. (Iniesta *et al.*, 2005). Hoy en día, es posible medir estas variaciones en la información genética a través de diferentes técnicas moleculares, una de las más utilizadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante la cual se puede estimar la variación en la longitud de las repeticiones en tándem amplificando los fragmentos que contiene los microsatélites, utilizando cebadores flanqueantes únicos (Vendramin *et al.*, 1996; Araguren Méndez *et al.*, 2005).

### **3.8 Consanguinidad**

El aumento de la consanguinidad y la carga genética son de gran preocupación cuando se trata de especies en declive, debido a sus posibles consecuencias negativas para la viabilidad de los individuos y poblaciones. La endogamia, es una fuerza evolutiva que actúa cuando los apareamientos no son al azar sino entre individuos relacionados. En este caso los alelos idénticos por descendencia se encuentran juntos y con mayor frecuencia y se redistribuyen en las frecuencias de los genotipos aumentando la homocigosis. Para mantener la variación genética en las poblaciones de programas de cría cautividad, se debe minimizar el parentesco, pues, la ocurrencia de depresión por endogamia es un problema recurrente en las poblaciones aisladas, siendo ampliamente documentado en poblaciones cautivas y silvestres (Godoy, 2009; Hedrick 2001; Serna Launes y Díaz Rivera, 2011).

### **3.9 Marcadores moleculares**

En la actualidad existen diferentes técnicas que permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones (Eguiarte, 2007). La aplicación y el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido logrado que los análisis genéticos sean más viables, en especial y luego del descubrimiento de la Reacción en Cadena de La Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), se ha podido profundizar en el estudio y la medición de la variabilidad genética. Este tipo de estudio es de gran importancia en la



investigación para la conservación de las especies (Aranguren-Méndez et al., 2005; Hedrick, 2001).

El uso de diferentes marcadores moleculares ha sido de gran utilidad en estudios genéticos y de conservación, ya que por medio de estos se puede hacer una evaluación del estado genético de las poblaciones, pues permiten la descripción de patrones genéticos en las poblaciones desde individuos hasta especies. (Godoy, 2009). Existen diferentes tipos de marcadores moleculares y diversas técnicas para su uso, la selección del marcador y el uso de los mismos dependerá de un fin específico, es decir de la información que se requiera (Jiménez y Collada, 2000). Un buen marcador debe presentar ciertas características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe estar ampliamente distribuido a lo largo del genoma, además de que debe poseer un alto grado de polimorfismo (Aranguren-Méndez et al., 2005).

Los marcadores moleculares pueden proveer diferentes datos de la población en estudio como: una estimación de la variabilidad genética, el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ), cuellos de botella, flujo genético, fundadores, endogamia, identificación de individuos e incluso híbridos dentro de un grupo particular (Hedrick, 2001.) A partir de estos datos se pueden inferir relaciones filogenéticas, geográficas, parentesco, o analizar procesos que ocurrieron o están ocurriendo en las poblaciones (Jiménez y Collada, 2000). De esta manera se puede conocer más acerca de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies en peligro, con el fin de proponer medidas para preservar la diversidad genética. (Godoy, 2009).

### **3.10 Microsatélites**

El estudio de la genética de poblaciones es uno de los campos en los que el uso de microsatélites como marcador molecular ha destacado, debido a su alto grado de polimorfismo, a la gran cantidad de genomas en los que se pueden localizar y a la posibilidad de detectar cada uno de los alelos por locus, lo que hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar, permitiendo estimar con mayor exactitud la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones. (Vendramin et al., 1996; Aranguren-Méndez et al., 2005).

Los microsatélites son herramientas moleculares muy confiables, relativamente fáciles de automatizar y pueden brindar información a diferentes niveles. El análisis con estos marcadores involucra la detección de fragmentos específicos de ADN, dando como resultado la medida de los alelos en pares de bases de cada una de las regiones analizadas (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Son secuencias simples repetidas (SSR por sus siglas en inglés: simple sequence repeats) de ADN repetidas en tándem, de 1 a 6 pares de bases y se distribuyen de forma aleatoria a lo largo del genoma de los seres vivos. Presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes y no están sujetos a recombinación, por lo que los cambios acumulados se deben solo a procesos demográficos y de mutación (Vendramin, 1996; Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Eguiarte *et al.*, 2007). Estos marcadores se clasifican de acuerdo a su composición, esta puede ser desde repeticiones de un mismo nucleótido (mononucleótidos), hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Los microsatélites que están compuestos por un motivo único se consideran puros o perfectos; aquellos conformados por dos o más motivos se denominan compuestos y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de la repetición (Schlötterer, 2000). Los microsatélites mononucleótidos y dinucleótidos son más abundantes y tienen una tasa de mutación mayor que los demás, por lo que son apropiados para detectar diferencias entre individuos de una misma población. Mientras que los microsatélites con repeticiones de tres o más nucleótidos muestran menor variabilidad y permiten la determinación de paternidad y el análisis de variación entre poblaciones e incluso entre especies pueden ser amplificados y utilizados como marcadores genéticos en especies relativamente distantes (Vendramin *et al.*, 1996).

### **3.11 Microsatélites para el género *Crocodylus***

Actualmente para el estudio básico de la genética de las poblaciones, existe la necesidad de contar con marcadores genéticos con un alto grado de polimorfismo (Glen *et al.*, 1998). Los marcadores microsatélites se han convertido en poderosas herramientas para la genética de poblaciones, estos han sido utilizados con éxito para evaluar la diversidad genética y estudiar las características ecológicas del

comportamiento y la relación de las poblaciones en diferentes especies silvestres y cautivas (Zucoloto *et al.*, 2006). La mayoría de los microsatélites son altamente polimórficos y susceptible de análisis automatizado, lo que los convierte en los marcadores genéticos de elección para abordar preguntas sobre la composición genética de las poblaciones (Glen *et al.*, 1998).

En cocodrilidos se ha confirmado que los microsatélites son altamente polimórficos para este grupo de vertebrados (Dever y Densmore, 2001). Sin embargo, gran parte de los microsatélites no se conservan entre familias, presuntamente por cambios en los sitios de preparación por lo que se requiere el desarrollo de cebadores específicos del género (FitzSimmons *et al.*, 2000). El desarrollo de una biblioteca de cebadores para una especie en particular implica un gasto considerable de recursos. Es por esta razón que investigadores han buscado utilizar cebadores desarrollados para una especie en otra (Zucoloto *et al.*, 2006; Vendramin *et al.*, 1996), tomando en cuenta que, los loci microsatélite se conservan lo suficiente entre varias especies para ser útiles como marcadores interespecífico e intraespecíficos (Bashyal *et al.*, 2014). Por consiguiente, el uso de cebadores en especies cruzadas plantea la posibilidad de incrementar su aplicación, aumentando así la cantidad de información que se puede obtener de estos marcadores, pues de otro modo sería necesario diseñar cebadores específicos para la especie a estudiar, lo que requeriría una cantidad considerable de tiempo y recursos (Dever y Densmore, 2001).

La amplificación exitosa de loci microsatélites en especies cruzadas ha sido reportada por diversos autores, Glenn *et al.* (1998) informaron sobre la capacidad de amplificación de los cebadores desarrollados para *A. mississippiensis* en otras especies del género *Crocodylus*, confirmando la amplificación positiva del 60% de todas las pruebas realizadas en su estudio. Las amplificaciones positivas fueron más comunes en las especies estrechamente relacionadas con los caimanes americanos. Por ejemplo, *A. sinensis* mostró un 94% de amplificaciones positivas, mientras que para el género Alligatoride (*Caiman*, *Melanosuchus* y *Paleosuchus*) amplificaron de forma positiva en un 72% de las pruebas. Para especies de otras familias (*Tomistoma*, *Gavialis* y *Crocodylus*) los resultados positivos se dieron con

menos frecuencia. Así mismo, estos microsatélites revelaron altos niveles de variabilidad intra e interpoblacional, demostrando su utilidad como marcadores genéticos en otras especies de cocodrilos. Además, de los microsatélites utilizados en la prueba hubo dos que amplificaron positivamente para todas las especies en las que fueron probados. Lo que indica que algunos *loci* parecen conservarse más que otros a través de las especies. Bajo este precepto, FitzSimmons *et al.* (2000), desarrollaron la primera biblioteca de microsatélites para *Crocodylus* a partir de ADN de *C. jhonstoni*, *C. porosus* y *C. acutus*, indicando la presencia de *loci* microsatélites homólogos, los cuales fueron sido amplificados con éxito en diversas especies de cocodrilianos.

De esta manera, las investigaciones realizadas en especies cruzadas con marcadores microsatelites, sugieren que los conjuntos de cebadores previamente desarrollados específicamente para una especie, pueden ser aplicados en las diferentes especies de cocodrilidos, tomando en cuenta que la transferencia es más efectiva a nivel familia o subfamilia (Glenn *et al.*, 1998).

El cocodrilo de pantano, se aprovecha en cautiverio y la conservación de su variación genética es esencial para su explotación y en la toma de decisiones para la liberación de las crías, sin embargo poco se ha estudiado acerca de la dinámica genética de sus poblaciones, aspecto fundamental para establecer políticas de manejo que garanticen su futuro. (Serna-Lagunes y Díaz Rivera, 2011). En programas de gestión para la conservación de especies amenazadas y para poblaciones ecológicamente y comercialmente importantes se debe incluir monitoreo genético. Dado que los problemas genéticos derivados de la endogamia minimizan los procesos básicos de adaptación local de las especies al conducir a un deterioro genético de ciertos atributos, como la fertilidad, la resistencia a enfermedades (depresión endogámica) y viabilidad de las crías hasta su estado adulto. Los ingresos económicos de las UMA podrían verse afectados, pues dicha problemática se refleja en gran parte en caracteres morfológicos, lo que conlleva a obtener pieles que no cumplan con los estándares requeridos (Serna-Lagunes *et al.*, 2012; Flint *et al.*, 2000).

Diferencias morfológicas dentro de las poblaciones podría ser indicio de cambios en la variabilidad genética (Serna-Lagunes, 2010). Uno de los propósitos principales de las UMA es la reintroducción de individuos al medio silvestre, lo cual que no ha sido posible porque la información sobre la composición genética de las poblaciones reproducidas en cautiverio aún es escasa, es decir se desconoce el nivel de variación genética de los individuos que podrían ser destinados para este fin .Se estima que menos de 1% de la biota nacional se ha estudiado desde la perspectiva genética (SEMARNAT, 2009; Serna-Lagunes y Díaz-Rivera, 2011; Serna-Lagunes *et al.*, 2012).

La determinación de la estructura genética de las poblaciones se ha convertido en una herramienta efectiva para la adecuada administración de la vida silvestre (Dever y Densmore, 2001). Y un instrumento que ha resultado de gran utilidad para el desarrollo de estos estudios, son los marcadores moleculares microsatélites, los cuales tiene la ventaja de poder ser utilizados de manera cruzada entre diversas especies. Mediante el uso de estos marcadores, se ha demostrado su eficiencia para generar datos específicos sobre variabilidad genética, parentesco, estructura poblacional e incluso hibridación entre especies de cocodrilianos.

Para probar la amplificación cruzada en cocodrilianos Dever y Densomre. (2001) analizaron tres cebadores desarrollados para *C. jhonstoni* (FitzSimmons *et al.*, 2000), en otras especies y géneros de cocodrilos, observando una variación en la amplificación entre géneros. Para el género *Crocodylus* se obtuvieron amplicones para todos los loci examinados. Corroborando esta información con el estudio de FitzSimmons *et al.* (2000), donde se amplificaron con éxito loci polimórficos para para varios *Crocodylus spp.* De la misma manera FitzSimmons *et al.* (2002) caracterizaron individuos cautivos y silvestres de *C. siamensis*, *C. rhombifer* y *C. porosus* en Vietnam por medio de microsatélites desarrollados para *C. jhonsoni*, con el fin de distinguir organismos puros de posibles híbridos para su reintroducción al medio silvestre.

Asimismo, Xu *et al.* (2005) estudiaron la aplicación de microsatélites desarrollados para *Alligator mississippiensis* como marcadores en especies cruzadas y la

funcionalidad de los mismos para un estudio de variación genética en poblaciones cautivas de *Alligator sinensis* (caimán chino). Los primers diseñados para *A. mississippiensis* (Glen *et al.*, 1998) mostraron una tasa exitosa de amplificación de 95.5% al usarse en *Alligator sinensis*, indicando que es factible el uso de estos marcadores para abordar cuestiones importantes en la conservación, como la pérdida de diversidad genética y el aumento de la endogamia en las poblaciones cautivas de caimán chino, lo cual podría ser de gran utilidad para la selección de individuos para un programa de reintroducción al medio natural. Por su parte Zucoloto *et al.* (2006) evaluó con éxito la capacidad de amplificación de los marcadores microsatélites desarrollados para *Alligator mississippiensis* y *Caiman latirostris* en *Caiman crocodilus*, *Caiman yacare* y *Paleosuchus palpebrosus*, una de las más amenazadas entre las 23 especies de cocodrilos. Con una eficiencia de amplificación heteróloga de 100% entre los caimanes y 84.6% para *C. latirostris* y *P. palpebrosus*. En la misma línea de investigación, Bashyal (2014) probó la amplificación cruzada de 10 microsatélites, provenientes de la biblioteca de *C. porosus* (Miles *et al.*, 2008), en especies de cocodrilos neotropicales (*C. acutus*, *C. moreletii*, *C. rhombifer* y *C. intermedius*.) observando una amplificación exitosa entre las cuatro especies.

Específicamente para *C. moreletii*, Dever y Densmore (2001) probaron la efectividad de 16 pares de cebadores desarrollados para las especies *C. porosus*, *C. jhonstoni* y *C. rhombifer* (FitzSimmons *et al.*, 2000). Las bibliotecas de marcadores para *C. jhonstoni* amplificaron consistente consistentemente en *C. moreletii*, haciendo posible la una identificación individual. Determinando así la eficiencia de estos loci microsatélite para la estimación de la estructura genética dentro y entre las poblaciones de esta especie.

Por otra parte, Flint *et al.* (2000), compararon los niveles de variación genética registrados anteriormente para poblaciones silvestres y en cautiverio de *Alligator mississippiensis* y *Crocodylus niloticus*, con la variación obtenida para una Granja de cocodrilos de Kwena Gardens, para determinar si los cocodrilos criados para uso comercial tenían diferentes niveles de variación genética en comparación a los previamente reportados para vida libre. Los niveles de variación obtenidos son

considerados bajos, posiblemente a causa del cautiverio. Del mismo modo, Davis *et al.*, en 2001 evaluaron la estructura genética de seis poblaciones de *Alligator mississippiensis* en Estados Unidos, por medio de cinco *loci* microsatélites, la cantidad de variación genética detectada por estos microsatélites fue alta y cada una de las poblaciones mostró una diferenciación genética significativa. Por su parte Dever *et al.* (2002), por medio de microsatelites determinaron la composición genética de las poblaciones de *C. moreletii* en siete localidades del centro norte de Belice, evaluando la variabilidad genética y el flujo entre poblaciones. El análisis con microsatélites reveló niveles relativamente altos de variación genética, además de que no se encontró evidencia de cuellos de botella. Así mismo, los hallazgos sugieren movimientos frecuentes de individuos dentro de las localidades. De Thoisy *et al.* (2006), estudiaron y compararon la estructura genética de siete poblaciones de *Melanosuchus niger* (Caimán negro) en Sudamérica, analizando la diversidad genética, la heterosigocidad y el número de alelos entre las poblaciones. En dicho estudio mencionan que a pesar que las poblaciones han reducido sus niveles iniciales debido a la presión por la cacería, no se observó una fuerte pérdida de la diversidad genética. Además, la variación interpoblacional de alelos muestra una fuerte diferenciación, es decir que las poblaciones se aislaron significativamente entre sí. Isberg *et al.* (2004), afectaron pruebas de paternidad basándose en marcadores microsatelites, para una población cautiva de cocodrilos de agua salada (*Crocodylus porosus*), como parte de un programa de mejora genética basado en la selección de organismos para su reproducción a futuro. En la asignación de parentesco encontró que 5.6% de los organismos juveniles presentaban genotipos incompatibles con su parentesco registrado. Con base en esto, determinó que los 11 microsatélites (FitzSimons *et al.*, 2000) evaluados en este estudio proporcionan la suficiente confianza (99.80%) para ser utilizados en conjunto como pruebas de paternidad para confirmar el origen de la descendencia de organismos mantenidos en sistemas de crianza de forma desordenada.

### 3.12 Objetivo

2. Evaluar la variabilidad genética existente para cada una de las UMA muestreadas y establecer un diagnóstico de situación para cada una de las poblaciones muestreadas.

### 3.13 Metodología

#### 3.13.1 Toma de muestras

Para esta investigación fue necesaria la toma de muestras biológicas de tejido y/o sangre, esto en función de las posibilidades y el personal disponible en cada una de las UMA. Para la obtención y manejo de muestras biológicas, fue indispensable el uso de guantes para protección tanto de quien toma la muestra como del organismo del que se obtiene la dicha muestra, pues el contacto directo con los tejidos y la sangre podría representar un riesgo en la transmisión de enfermedades zoonóticas y o bacterias que pudiesen albergar los organismos.

#### **Extracción de muestras de sangre**

Las muestras de sangre en cocodrilianos se utilizan principalmente para efectos de salud en general y/o proyectos de investigación en laboratorio relacionados con la conservación de la especie. En general la cantidad de sangre a extraer dependerá del tamaño del organismo y el tipo de análisis que se requiera, para los fines de esta investigación la cantidad que se extrajo fue de 2 ml, suficiente para llevar a cabo los análisis necesarios.

La muestra sanguínea se obtuvo a partir de la vena caudal localizada a lo largo de la cola, esta se encuentra ventral a las vértebras de la misma. Se escogió esta técnica debido a que permite obtener una buena muestra en cuanto a volumen, rapidez de ejecución y el riesgo que representa para el animal es mínimo en comparación con otras técnicas (Troiano, 2013).

Para la extracción de la muestra, el animal fue colocado en posición decúbito ventral (boca abajo), levantando la cola en un ángulo de aproximadamente 90° y manteniéndola derecha, esta se divide en tres porciones imaginarias a partir de la cloaca, en la segunda porción aproximadamente a la altura de la octava línea de escamas a un tercio de distancia en la línea media, se limpia la zona con una torunda humedecida con alcohol y la aguja es introducida lentamente en ángulo



recto hasta llegar al hueso, una vez ahí esta se retira suavemente creando vacío en la misma para obtener la muestra, por último se hace presión con una con una torunda sobre la zona donde se obtuvo la muestra y se rocía un poco de aluminio micronizado (Aluspray) para evitar infecciones (Jacobson, 1984; Troiano, 2013).

#### **Conservación y traslado de la muestra sanguínea.**

Una vez que se obtenida la muestra de sangre, esta se depositaba en tubos al vacío, ya sea con Heparina de litio o EDTA, previniendo de esta manera, la coagulación de la muestra. Utilizar heparina de litio o heparina de sodio no interfieren en los resultados del análisis de bioquímica en cocodrilos, por lo que se podía usar indistintamente uno u otro tipo de anticoagulante (Padilla *et al.*, 2009). Para depositar la sangre en los tubos, la aguja se introduce a través de la tapa de este, colocándolo en un ángulo de 45° y girando suavemente mientras la sangre se desliza por las paredes del mismo. Una vez que la sangre se encuentra en el tubo, se procedió con el rotulado correspondiente, el cual contenía los siguientes datos:

- 1.-Número de muestra.
- 2.-Número de organismo.
- 3.-Especie.
- 4.-Lugar de procedencia.
- 5.-Fecha.

#### **Obtención de la muestra de tejido.**

Para obtener la muestra de tejido, en primera instancia, se debía verificar si el organismo contaba con algún tipo de marcaje por amputación de las escamas caudales, este tipo de marca se realiza con el corte de las crestas situadas en la parte dorsal y posterior de la cola, a las cuales se les asigna un número determinado dependiendo de su posición. Si el animal había sido marcado con anterioridad, se confirmaba la numeración del mismo para no confundir falsos marcajes, pues en algunos casos el marcaje es limitado a un lapso de entre 5 y 10 años. Debido al crecimiento y conducta natural de los cocodrilos, estos pueden tener diversas cicatrices y lesiones que fácilmente podrían confundirse con un

marcaje previo. Ya que el animal había sido identificado y descartado la posibilidad de un falso marcaje, la muestra se obtenía remarcando al animal con un corte raso en la base de las escamas ya amputadas. En caso contrario, se efectuaba el marcaje correspondiente siguiendo el patrón de identificación establecido dentro de la UMA (Martínez, 2008; Sánchez, 2001; Sánchez-Herrera, 2011).

Para realizar el corte de la quilla o escama, se utilizó una navaja para bisturí nueva para cada uno de los organismos. Primeramente, se debe limpiar el área con una torunda humedecida con alcohol etílico, posteriormente se sujeta la escama con los dedos índice y pulgar para realizar la amputación, el tejido es cortado desde la base de la escama, de manera rápida evitando la contaminación de la muestra, una vez hecho el corte se ejerce presión sobre la herida con una torunda humedecida con alcohol y finalmente se aplica Aluminio micronizado sobre esta para ayudar a la cicatrización y evitar infecciones.

#### **Conservación de la muestra de tejido.**

El tejido obtenido del corte de la escama o escamas, fue depositado en un tubo cónico de polipropileno estéril (Falcon) de 15ml que contenía alcohol etílico al 90%, asegurándose de que el alcohol cubriera todo el tejido para evitar la descomposición de la muestra. Después de depositar la muestra y asegurarse de que el tubo estuviera perfectamente cerrado, este debía ser rotulado con la misma información que las muestras de sangre.

#### **3.13.2 Trabajo de laboratorio**

Las muestras obtenidas fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología Agropecuaria en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, donde fueron procesadas para llevar a cabo el análisis correspondiente. Una vez en el laboratorio, el procesamiento de las muestras comenzó con la separación de las mismas, estas se clasificaron por UMA y método de extracción a utilizar. Se utilizaron 3 métodos de extracción de ADN uno para la sangre, otro para el tejido y uno más para aquellas muestras sanguíneas que presentaban coágulo (ver manual).

### **Extracción del ADN**

En general la extracción de ADN consta de 2 etapas, una de lisis celular, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido, y otra etapa de purificación, que involucra la separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Newsletter Microbial, 2009; Eguiarte *et al.*, 2007).

Para poder extraer el ADN, este debe ser separado de cualquier otro compuesto presente en la muestra, por lo que primeramente se lleva a cabo un proceso de lisis celular para liberar el ADN de la célula, en esta etapa se utilizó un buffer de extracción el cual contenía: 10 mM TRIS-HCL pH 8.0, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, además se agregó Proteinasa K para la degradación de proteínas y enzimas, también se incubó a una temperatura 56°C, con el fin de facilitar la ruptura de lípidos en la membrana celular. La separación de los componentes no solubles como las proteínas y lípidos, se llevó a cabo por medio de solventes orgánicos (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico) y centrifugación liberando así el ADN al medio. Después de eliminar los lípidos y las proteínas, se adiciona etanol y NaCl que se unen a los grupos fosfato, reduciendo las fuerzas repulsivas entre las cadenas, esto permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. La centrifugación enviara el ADN al fondo del tubo permitiendo que el etanol sea eliminado fácilmente el por decantación. Por último, un lavado con etanol al 70% eliminará los residuos de etanol y el resto se evaporará (Eguiarte *et al.*, 2007).

Una vez que se tiene la pastilla de ADN (medusa) y se ha evaporado el etanol, el siguiente paso es resuspender el ADN con una solución amortiguadora de Tris-HCL a 10Mm y EDTA a 0.1M a un pH DE 8.0 (TE). Por ultimo para evitar la fragmentación de las moléculas de alto peso molecular, se incubó a 55°C con agitación suave por 1 hora (Alejos *et al.*, 2014).

### **Verificación de la integridad del ADN**

Posterior a la extracción del ADN resulta importante verificar la presencia e integridad del mismo, para lo cual se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% empleando TAE (Tris-Acetato EDTA) a una concentración final de 1x como buffer para la preparación del gel y como medio para llevar a cabo la

electroforesis. Esta técnica consiste en la migración de partículas a través de la agarosa por medio de un campo electromagnético, en el caso del ADN, la carga netamente negativa de este hará que se mueva en dirección al ánodo. La agarosa funciona como una red, donde a mayor concentración de la misma el tamaño de los poros disminuye, y viceversa lo cual nos permite determinar el rango de tamaños que se pretende separar (Fierro, 2014).

### **Cuantificación del ADN**

Después de verificar que la extracción de ADN haya sido satisfactoria, es necesario determinar la cantidad de material genético obtenido, pues concentraciones muy bajas de ADN dificultan la amplificación por medio de la PCR. Para estimar la concentración y pureza del ADN, se utilizó un espectrofotómetro (Beckman Coluter DU 730) a una longitud de onda de 260 nm, que es la longitud a la cual el ADN absorbe la luz UV. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores indican la presencia de proteínas.

### **Tinción con Bromuro de Etidio**

Como colorante para la visualización de los ácidos nucleicos, se preparó una solución de bromuro de etidio en H<sub>2</sub>O destilada a una concentración 10mg/ml .En esta solución se sumergió el gel de agarosa durante un lapso de 10 minutos. En este tiempo se espera que el bromuro de etidio se intercale entre las bases nitrogenadas permitiendo posteriormente que la luz UV con una longitud de onda de 300nm produzca fluorescencia, lo que permite la visualización del ADN. Para esta visualización se empleó un Fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc), con el cual fue posible observar y registrar la posición y cantidad relativa del ADN presente en el gel (ver manual).

### **PCR**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), permite obtener in vitro millones de copias de un ADN a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular a partir de un ADN molde, por medio de varias proteínas para sintetizar dos nuevas

hebras. Durante esta replicación la enzima más importante es el ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN. La síntesis de nuevas cadenas a partir de un ADN molde se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene los fragmentos a amplificar; la polimerasa; primers o iniciadores; desoxinucleotidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), además de una solución amortiguadora que se encarga de mantener el pH adecuado durante la reacción. Esta mezcla se somete a varios ciclos compuestos de diferentes temperaturas y consta de tres etapas, la desnaturalización, el alineamiento y la extensión del ADN.

### **Desnaturalización**

Mediante un aumento en la temperatura a 94°C, se rompen los puentes de hidrogeno que unen al ADN logrando separar la estructura de doble hélice, quedando así dos moldes para la síntesis de una nueva cadena complementaria.

### **Alineación**

Una vez separadas las cadenas de ADN, se baja la temperatura para que los primers puedan alinearse a los sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar. La temperatura de alineación dependerá de cada primer.

### **Extensión**

Finalmente, la temperatura se incrementa nuevamente a 72°C para que la ADN polimerasa se una a los primers y comience la replicación sintetizando una nueva cadena de ADN en sentido 5' a 3'. Este aumento y disminución de temperatura o etapas se conjuntan en un ciclo el cual se repite en varias ocasiones permitiendo que las copias se incrementen de manera exponencial, dando como resultado millones de copias del fragmento seleccionado (Díaz *et al.*, 2014)

Los marcadores utilizados para esta investigación fueron desarrollados para la especie *C. jhonstoni* (FitzSimons *et al.*, 2000) y han sido amplificados con éxito de manera cruzada en *C. moreletii* (Dever y Densmore, 2001). Se ocuparon 7 *loci* microsatélites, en los cuales la secuencia reverse fue marcada con un

colorante fluorescente. Las condiciones utilizadas para la amplificación de las muestras se describen en la siguiente tabla:

**Cuadro 3. Se muestran los locus utilizados y las características de cada uno.**

LOCUS	INICIADORES	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO	TAMAÑO (pb)
Cj16	F: CATGCAGATTGTTCCCTGATG R: TGTCATGGTGTCAATTAAGCTC	58°C	132-152
Cj18	F: ATCCAAATCCCATGAACCTGAGAG R: CCGAGTGCTTACAAGAGGCTGG	60°C	190-192
Cj20	F: ACAATGGGGATCAGTGCAGAG R: GTTTCAAATCCACAGTCATATAGTCC	62°C	149-179
Cj35	F: GTTTAGAAGTCTCCAAGCCTCTCAG R: CTGGGGCAAGGATTTAACTCTC	58°C	144-165
Cj109	F: GTATTGTCAACCCACCGTGTC R: GTTTCCCCTCCACAGATTACTTGC	67°C	362-379
Cj119	F: GTTTGCTGTGGAATGTTTCTAC R: CGCTATATGAAACGGTGGCTG	60°C	175-179
Cj131	F: GTTTGTCTTCTCCTGTCCCTC R: AAATGCTGACTCCTACGGATGG	60°C	210-218

Los productos obtenidos de la PCR para los siete microsatélites en las 82 muestras fueron enviados a la Universidad de Illinois en Estados Unidos, para su estudio en un analizador de Fragmentos.

### 3.14 Análisis de los datos

Producto del analizador de fragmentos, se obtuvieron picos de intensidad generados por la fluorescencia emitida de los marcadores moleculares, los cuales fueron cotejados por medio del software **Peak Scanner 2.0**, el cual nos permite conocer los tamaños de cada uno de los alelos presentes en la población, basándose en dichos picos de intensidad. Los tamaños de los alelos son generados en decimales, por lo que deben ser ajustados a un número entero, esto se realiza por medio del software **TANDEM**, **TANDEM** redondea los tamaños decimales de los microsatélites por medio de un algoritmo.

Para determinar la estructura de la población se utilizó el programa **STRUCTURE 2.3.4**. (Pritchard *et al.*, 2000), el cual asigna a cada organismo a un posible grupo con base en su información genética. Posteriormente para establecer el número

óptimo de grupos diferentes (K) se recurrió al software en línea **STRUCTURE HARVESTER** (Earl y VonHoldt, 2012).

Los datos para determinar la variación genética en las poblaciones, fueron obtenidos con **GenALEx 6.503**, el cual se utiliza como un complemento de Excel. Para **establecer el parentesco existente** entre los organismos de cada población se ocupó el software Mrelatedness 1.0.3.

### 3.15 Resultados

Para la caracterización genotípica de las muestras se utilizaron siete cebadores desarrollados para la especie *Crocodylus johnsoni* (CJ109, CJ119, CJ20, CJ35, CJ18, CJ131, CJ16) (Tabla 3). Estos *loci* han sido utilizados y amplificados con éxito en otras especies de cocodrilos incluyendo *C. moreletii* y *C. acutus* (Dever y Densmore, 2001, FitzSimons *et al.*, 2000, Weaver *et al.*, 2008).

El análisis de los siete microsatélites empleados mostró que todos los loci eran altamente polimórficos con un porcentaje del 100%, también se encontró una considerable variación alélica entre las tres poblaciones. Se detectaron un total de 43 alelos para el total de la población. El número de alelos varió entre tres y 12, con un promedio de 6.14 alelos por locus para el total de la población. El locus con menor número de alelos fue el CJ18 (3) y el que obtuvo el mayor número de alelos fue el CJ20 (12).

El número de organismos que presentaron alelos diferentes para un mismo locus (Heterocigotos) varió de 5 (Cj 109) a 30 (Cj35) para San Fernando, de 8 (Cj109) a 22 (Cj35) para La Colorada y de 21 (Cj119) a 30 (Cj18) para el CICEA.

#### 3.15.1 Número de alelos

El número de alelos diferentes para cada población fue de 33 alelos para San Fernando (SF), 28 alelos para La Colorada (LC) y 38 alelos para el CICEA (CIC). El promedio de alelos por locus para cada población fue de cuatro para la LC, 4.71 para SF y 5.42 para la población del CIC.

**Cuadro 4. Muestra el número máximo de alelos diferentes por cada locus y el total de alelos para las tres poblaciones, La Colorada, San Fernando y El CICEA, así como el número de organismos que presentan alelos diferentes para cada locus.**

<b>Locus</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>San Fernando</b>	<b>La Colorada</b>	<b>CICEA</b>
<b>CJ109</b>	9	5	8	22
<b>CJ119</b>	6	19	18	21
<b>CJ20</b>	12	21	11	25
<b>CJ35</b>	4	30	22	29
<b>CJ16</b>	5	24	19	24
<b>CJ18</b>	3	29	21	30
<b>CJ131</b>	4	12	16	22
<b>TOTAL</b>	43	140	115	173

### **3.15.2 Frecuencias alélicas**

En las frecuencias alélicas obtenidas (Tabla 3), se aprecia que en la mayoría de los loci la distribución de las frecuencias se concentra en uno o dos alelos, incluso en aquellos loci que presentan el mayor número de polimorfismos. Asimismo, aquellos alelos que muestran una alta frecuencia en un locus determinado, conservan esta proporción para las tres poblaciones.

**Cuadro 5. Se observa el número de alelos diferentes presentes en cada locus para las tres poblaciones (La Colorada, San Fernando y El CICEA) y el total por cada población.**

<b>Población</b>	<b>CJ109</b>	<b>CJ119</b>	<b>CJ20</b>	<b>CJ35</b>	<b>CJ16</b>	<b>CJ118</b>	<b>CJ131</b>	<b>TOTAL</b>
<b>San Fernando</b>	6	6	8	3	5	2	3	33
<b>La Colorada</b>	7	5	6	2	3	2	3	28
<b>CICEA</b>	8	5	9	4	5	3	4	38



De la misma manera se puede observar la presencia de alelos privados para las tres poblaciones en al menos un locus. Para la UMA San Fernando en los *loci* CJ109, CJ119 y CJ20, en CJ20 para La colorada y en CJ 109, CJ20, CJ35 Y CJ18 para el CICEA (Tabla 3).

**Cuadro 6. Alelos privados obtenidos y su frecuencia en cada una de las tres poblaciones analizadas; San Fernando (SF), La Colorada (LC) y El CICEA (CIC).**

<b>Población</b>	<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>SF</b>	<b>CJ109</b>	378	0.100
<b>SF</b>	<b>CJ119</b>	172	0.053
<b>SF</b>	<b>CJ20</b>	153	0.024
<b>SF</b>	<b>CJ20</b>	165	0.024
<b>LC</b>	<b>CJ20</b>	173	0.045
<b>CIC</b>	<b>CJ109</b>	376	0.045
<b>CIC</b>	<b>CJ20</b>	151	0.020
<b>CIC</b>	<b>CJ20</b>	171	0.020
<b>CIC</b>	<b>CJ35</b>	160	0.017
<b>CIC</b>	<b>CJ18</b>	190	0.017

**Cuadro 7. Se muestran los alelos obtenidos y su frecuencia en cada locus analizado, así como su distribución en cada una de las tres poblaciones. La Colorada (LC), San Fernando (SF) y EL CICEA (CIC).**

Locus	Alelo	SF	LC	CIC	Locus	Alelo	SF	LC	CIC	Locus	Alelo	SF	LC	CIC
CJ109	362	0.100	0.063	0.114	CJ20	149	0.048	0.045	0.040	CJ35	158	0.500	0.500	0.438
	364	0.200	0.125	0.114		151	0.000	0.000	0.020		160	0.000	0.000	0.017
	366	0.200	0.188	0.205		153	0.024	0.000	0.000		164	0.483	0.500	0.483
	368	0.300	0.375	0.409		155	0.048	0.045	0.040		166	0.017	0.000	0.017
	370	0.000	0.063	0.045		157	0.095	0.000	0.140	CJ16	132	0.313	0.368	0.271
	372	0.000	0.125	0.045		159	0.024	0.045	0.060		134	0.479	0.526	0.521
	374	0.100	0.063	0.023		161	0.714	0.733	0.620		136	0.021	0.000	0.063
	376	0.000	0.000	0.045		163	0.024	0.000	0.040		138	0.021	0.000	0.021
	378	0.100	0.000	0.000		165	0.024	0.000	0.000		152	0.167	0.105	0.125
CJ119	172	0.053	0.000	0.000		167	0.000	0.045	0.020	CJ131	195	0.500	0.500	0.386
	174	0.053	0.083	0.048		171	0.000	0.000	0.020		209	0.458	0.469	0.455
	176	0.316	0.639	0.405		173	0.000	0.045	0.000		211	0.000	0.031	0.045
	178	0.158	0.139	0.381	CJ18	190	0.000	0.000	0.017		215	0.042	0.000	0.114
	180	0.263	0.083	0.095		192	0.466	0.500	0.517					
	182	0.158	0.056	0.071		194	0.534	0.500	0.467					

### 3.15.3 Heterocigosidad Observada y Heterocigosidad Esperada

La heterocigosidad representa una medida de la variación genética, siendo estudiada como Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigosidad esperada  $H_e$ ,  $H_o$  es la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y  $H_e$  es la probabilidad de que dos alelos tomados a la azar de la población sean diferentes. Los valores obtenidos para la  $H_o$  fueron mayores a los de la  $H_e$  en todos los locus para las poblaciones de San Fernando y La colorada, indicando un exceso de heterocigotos para estas poblaciones. El caso del CICEA es similar a los anteriores, mostrando valores de  $H_o$  mayores a los de  $H_e$ , con la excepción del locus CJ119 que revela un déficit de heterocigotos con una  $H_e$  (0.675) mayor a la  $H_o$  (0.619). Los valores de  $H_o$  variaron de 0.524 a 1.0 con un valor medio de 0.907 para San Fernando, 0.455 a 1.0 con un valor medio de 0.875 para La colorada y 0.619 a 1.0 para el CICEA, con una media de 0.895.

En las tres poblaciones el número efectivo de alelos ( $N_e$ ) fue inferior al número observado de alelos ( $N_a$ ), solo en la población de La Colorada el  $N_e$  y el  $N_a$  fueron iguales para los locus CJ35 Y CJ18 (Cuadro 5 y 6).

**Cuadro 8. Muestra los resultados del análisis realizado con los marcadores estudiados (CJ109, CJ119, CJ20, CJ35, CJ16, CJ18, CJ131) para la población de San Fernando. N=**número de organismos, **N<sub>a</sub>**= número de alelos, **N<sub>e</sub>**= número efectivo de alelos, **I**= Índice de Información, **H<sub>o</sub>**= Heterocigosidad observada, **H<sub>e</sub>**= Heterocigosidad esperada, **F**= Índice de fijación.

Población		CJ109	CJ119	CJ20	CJ35	CJ16	CJ18	CJ131
San Fernando	<b>N</b>	5	19	21	30	24	29	12
	<b>N<sub>a</sub></b>	6	6	8	3	5	2	3
	<b>N<sub>e</sub></b>	5.000	4.457	1.901	2.067	2.810	1.991	2.165
	<b>I</b>	1.696	1.608	1.110	0.766	1.176	0.691	0.837
	<b>H<sub>o</sub></b>	1.000	0.895	0.524	1.000	1.000	0.931	1.000
	<b>H<sub>e</sub></b>	0.800	0.776	0.474	0.516	0.644	0.498	0.562
	<b>F</b>	-0.250	-0.154	-0.105	-0.938	-0.553	-0.871	-0.858

**Cuadro 9. Muestra los resultados del análisis realizado con los marcadores estudiados (CJ109, CJ119, CJ20, CJ35, CJ16, CJ18, CJ131) para las poblaciones de La colorada y el CICEA. N=número de organismos, Na= número de alelos, Ne= número efectivo de alelos, I= Índice de Información, Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada, F= Índice de fijación.**

<b>Población</b>		<b>CJ109</b>	<b>CJ119</b>	<b>CJ20</b>	<b>CJ35</b>	<b>CJ16</b>	<b>CJ18</b>	<b>CJ131</b>
<b>La Colorada</b>	<b>N</b>	8	18	11	22	19	21	16
	<b>Na</b>	7	5	6	2	3	2	3
	<b>Ne</b>	4.571	2.250	1,646	2.000	2.359	2.000	2.124
	<b>I</b>	1.721	1.135	0.902	0.693	0.943	0.693	0.810
	<b>Ho</b>	1.000	0.722	0.455	1.000	0.947	1.000	1.000
	<b>He</b>	0.781	0.556	0.393	0.500	0.576	0.500	0.529
	<b>F</b>	-0.280	-0.300	-0.158	-1.000	-0.644	-1.000	-0.889
<b>CICEA</b>	<b>N</b>	22	21	25	29	24	30	22
	<b>Na</b>	8	5	9	4	5	3	4
	<b>Ne</b>	4.137	3.073	2.418	2.143	2.743	2.062	2.696
	<b>I</b>	1.692	1.291	1.361	0.843	1.207	0.765	1.113
	<b>Ho</b>	1.000	0.619	0.760	1.000	0.917	0.967	1.000
	<b>He</b>	0.758	0.675	0.586	0.533	0.635	0.515	0.629
	<b>F</b>	-0.319	0.082	-0.296	-0.857	-0.443	-0.877	-0.589

### 3.15.4 Equilibrio de Hardy Weinberg

La prueba de EHW mostró desviaciones en la mayoría de los locus para las tres poblaciones.

**Cuadro 10. Muestra el resultado de la prueba de Chi<sup>2</sup> para el EHW. No significativa (ns) Significativa (\*p < 0.05, p < 0.01 \*\*, p < 0.001 \*\*\*).**

<b>Población</b>	<b>Locus</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Significancia</b>
SF	CJ109	0.246	ns
SF	CJ119	0.029	*
SF	CJ20	0.998	ns
SF	CJ35	0.000	***
SF	CJ16	0.000	***
SF	CJ18	0.000	***
SF	CJ131	0.007	**
LC	CJ109	0.293	ns
LC	CJ119	0.836	ns
LC	CJ20	1.000	ns
LC	CJ35	0.000	***
LC	CJ16	0.002	**
LC	CJ18	0.000	***
LC	CJ131	0.001	**
CIC	CJ109	0.007	**
CIC	CJ119	0.062	ns
CIC	CJ20	1.000	ns
CIC	CJ35	0.000	***
CIC	CJ16	0.000	***
CIC	CJ18	0.000	***
CIC	CJ131	0.001	***

### 3.15.5 Estructura de la población

La estructuración y asignación de individuos a su población origen se obtuvieron utilizando el método de agrupamiento bayesiano implementado por el software STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard *et al.*, 2000), el cual asume que hay K poblaciones distintas, o grupos genéticos, cada uno con un conjunto diferente de frecuencias alélicas. Se utilizó un modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas

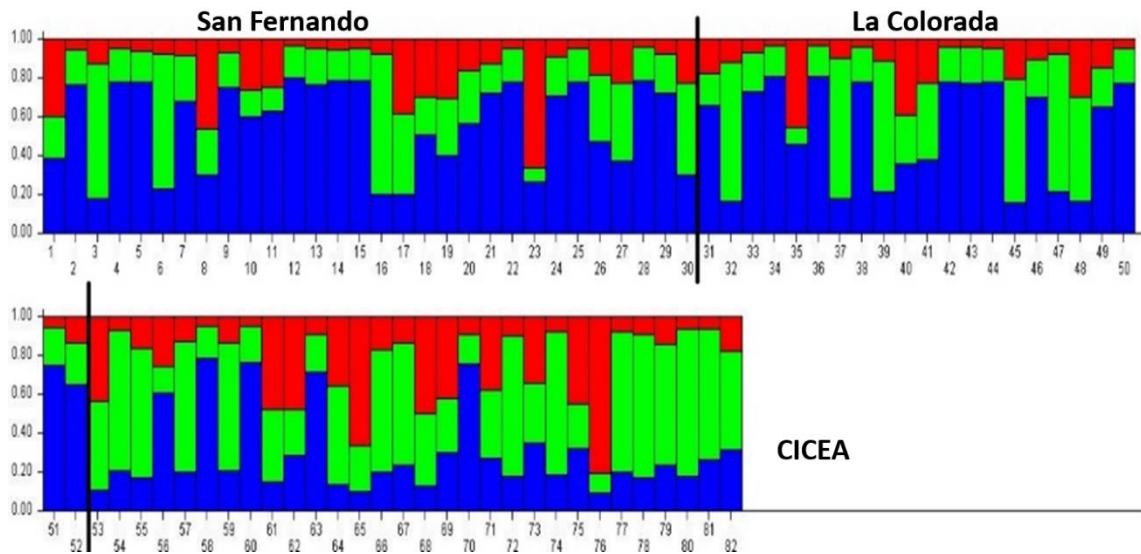
sin información previa. Se corrieron 100000 interacciones de MCMC (descartando 10, 000) Para cada valor de K se obtuvieron 10 repeticiones. K fue definido utilizando el método propuesto por Evanno *et al.* (2005), implementado en el software STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012) donde la K verdadera es la mayor delta K (DK) promediada a través de las corridas. Los resultados del análisis realizado para determinar la estructura de la población, nos muestra el máximo valor para Delta K (3.894151), el cual nos indica que el número óptimo de grupos diferentes de K= 3 (Tabla 7).

Por otra parte, en el clúster obtenido para la estructura poblacional con base en la probabilidad de asignación de la información genética, muestra una mínima diferenciación entre las tres poblaciones, sin embargo, esta diferenciación es relativamente más notoria para la población de la UMA CICEA con respecto a la LC y SF (Figura3)

**Cuadro 11. Muestra los valores de Delta K, resaltando el máximo valor de esta (3.894151), asumiendo de esta manera que el número óptimo de poblaciones es K=3.**

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	20	-1485.120000	0.486231	—	—	—
2	20	-1574.410000	49.233695	-89.290000	148.740000	3.021102
3	20	-1812.440000	75.089542	-238.030000	292.410000	3.894151
4	20	-1758.060000	163.530999	54.380000	28.925000	0.176878
5	20	-1732.605000	135.524317	25.455000	131.775000	0.972335
6	20	-1838.925000	68.808758	-106.320000	143.635000	2.087452
7	20	-1801.610000	82.881716	37.315000	56.315000	0.679462
8	20	-1707.980000	99.578457	93.630000	92.990000	0.933837
9	20	-1707.340000	59.187067	0.640000	25.335000	0.428050
10	20	-1681.365000	83.622229	25.975000	—	—

**Figura 3. Clúster de la estructura de la poblacional para cada UMA obtenida del análisis con el software STRUCTURE. Cada individuo está representado por una barra vertical y la longitud de cada color de cada barra indica la probabilidad de pertenencia a esa población.**



### 3.15.6 Distancia Genética

El análisis de las distancias genéticas entre pares de poblaciones nos indica que el grado de diferenciación entre estas es mínimo. El valor obtenido para la diferenciación entre CIC y LC es de 0,035, para SF y LC el valor de diferenciación fue de 0,037 y para CIC y SF de 0,035.

**Cuadro 12. Distancia Genética comparada entre pares para las tres poblaciones estudiadas San Fernando, la Colorada y el CICEA.**

San Fernando	La colorada	CICEA	
0.000			San Fernando
0.037	0.000		La Colorada
0.035	0.035	0.000	CICEA

### 3.15.7 Identidad Genética (Nei, 1972)

Los valores obtenidos en el análisis de identidad genética varían muy poco entre una y otra población, para LC y SF indica 0,964, para SF y CIC el valor fue de 0,965 y para LC y CIC 0,966 (Tabla 10).

**Cuadro 13. Identidad Genética comparada entre pares para las tres poblaciones estudiadas.**

San Fernando	La colorada	CICEA	
1.000			San Fernando
0.964	1.000		La Colorada
0.965	0.966	1000	CICEA

### 3.15.8 Estadísticos de F (Fis, Fit, Fst).

Estos coeficientes están relacionados con el parentesco y miden el grado de diferenciación del individuo con respecto a la subpoblación (Fis), del individuo hacia el total de la población (Fit) y de la subpoblación al total de la población (Fst). En este caso los valores de Fis para todos los locus fueron negativos, con valores que van desde -0,282 para el locus CJ109 hasta -0,936 para el locus CJ35, con una media de -0,537. Al igual que Fis, Fit muestra valores negativos para todos los locus.

De acuerdo con los valores obtenidos para el total de la población Fst, nos indica que entre estas tres poblaciones existe muy poca diferenciación.

**Cuadro 14. Estadísticos de F. Fis=diferenciación en individuos en relación con la subpoblación, Fit= diferenciación en individuos en relación a la población total. Fst= diferenciación en subpoblaciones en relación a la población total,**

Locus	Fis	Fit	Fst
<b>CJ109</b>	-0.282	-0.264	0.014
<b>CJ119</b>	-0.115	-0.051	0.057
<b>CJ20</b>	-0.196	-0.174	0.018
<b>CJ35</b>	-0.936	-0.935	0.001
<b>CJ16</b>	-0.543	-0.535	0.006
<b>CJ18</b>	-0.916	-0.911	0.003
<b>CJ131</b>	-0.768	-0.751	0.010
<b>Promedio</b>	-0.537	-0.517	0.015
<b>Desviación Estándar</b>	0.131	0.137	0.007



### 3.16 Relaciones entre organismos

Para estimar la relación entre pares de individuos, se utilizó el programa **Mrelatedness** 1.0.3, el cual realiza un cotejo de la información genética, estableciendo cuales organismos comparten alelos. Con base en esta información y conociendo el sexo de los animales, se sugirieron apareamientos para reducir mantener la variación genética en la descendencia.

**Cuadro 15. Muestra aquellos organismos en los que se identificó el menor parentesco, identificados por el numero asignado por la UMA La Colorada y clasificados en Hembras y Machos sugiriendo posibles apareamientos para mantener la variación genética en la población.**

UMA La Colorada	
Machos	Hembras
Número de identificación del organismo	Número de identificación del organismo
2	22
6	22
11	22
22	1-2
25	22
27	22
29	22
6	22
71	22
89	22
75	22
101	22
192	22
1056	1-2-22-65
x2	22
x3	1-22-65
x4	22
x5	2-22-62-65

**Cuadro 16. Muestra aquellos organismos en los que se identificó el menor parentesco, identificados por el número asignado por la UMA CICEA y clasificados en Hembras y Machos sugiriendo posibles apareamientos para mantener la variación genética en la población.**

<b>UMA CICEA</b>	
<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<b>Número de identificación del organismo</b>	<b>Número de identificación del organismo</b>
63	147-305-391
90	8-43-147-305-360-391-423-430
101	8-134-305-360-391-423-430
229	134-140-147-148-305-392-428-1072
355	134-189-305-360-392-423-428-442
526	8-43-134-143-148-305-360-391-423-428-430-442-667-1072
539	8-22-43-134-140-143-360-391-392-423-428-430-442-667
1300	8-22-43-189-423-428-430-667
2161	8-189-360-423-430
2199	8-43-147-305-360-391-423-430
2181	147-305-391

**Tabla 17. Muestra aquellos organismos en los que se identificó el menor parentesco, identificados por el número asignado por la UMA San Fernando y clasificados en Hembras y Machos sugiriendo posibles apareamientos para mantener la variación genética en la población.**

<b>UMA San Fernando</b>	
<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<b>Número de identificación del organismo</b>	<b>Número de identificación del organismo</b>
45	16-21-23-28-43-46-130

### 3.17 Discusión

En cocodrilianos han sido probados con éxito cebadores en forma cruzada, es decir desarrollados para una especie y amplificados en otras. La amplificación cruzada en cocodrillidos ocurre principalmente entre especies de la misma familia, sin embargo, en los cocodrilianos gran parte de los microsatélites no se conservan entre familias (FitzSimmons *et al.*, 2000). Por lo tanto, el uso de bibliotecas de cebadores desarrolladas para especies relativamente distantes, es posible siempre y cuando pertenezcan a la misma familia (Vendramin *et al.*, 1996). Los siete microsatélites utilizados en este estudio, fueron desarrollados para *C. jhonstoni* y amplificados con éxito en *C. moreletti*, presentando un 100% de polimorfismo. Dichos resultados son consistentes con el alto grado de polimorfismo exhibido por estos marcadores moleculares, en trabajos realizados con anterioridad donde la amplificación cruzada entre especies del género *Crocodylus* ha sido realizada con éxito, demostrando de esta manera la presencia de microsatélites que son homólogos entre especies (Dever y Densmore, 2001; FitzSimmons *et al.*, 2000; Cuervo-Alarcón y Burbano Montenegro, 2012; Gonzales-Trujillo, 2012).

En cuanto a las frecuencias alélicas obtenidas, se pudo observar que la mayor parte de estas, se encontraba concentrada en uno o dos alelos y esta proporción se repetía en el mismo alelo para el mismo locus en las tres poblaciones. Algo similar, a lo reportado por Dever *et al.* (2002) para poblaciones de la misma especie en Belice, donde las frecuencias se distribuyen de tal manera que un solo alelo acumula la mayor frecuencia en un locus determinado y esta se mantiene para el mismo locus en todas las poblaciones. Cabe resaltar, que los microsatélites utilizados por Dever *et al.* (2002) son los mismos que se emplearon en esta investigación. Esta diferencia en la proporción de las frecuencias, podría ser causada por fluctuaciones al azar por la acción de la deriva genética, propiciando el aumento de la frecuencia de determinadas variantes alélicas en la población, con el consecuente detrimento de otras (Milián-García *et al.*, 2011). De esta manera, algunos alelos pueden llegar a fijarse en la población y aquellos alelos que se encuentran entre los que presentan frecuencias más bajas, son los

que por deriva tienen más posibilidad de perderse en las poblaciones en cautiverio, sobre todo si no hay una contribución de todos los individuos a las siguientes generaciones (Cuervo- Alarcón y Burbano Montenegro, 2012). Asimismo, Cuervo- Alarcón y Burbano Montenegro (2012) mencionaron, que esto también podría ser evidencia de una falta de muestreo en el proceso de fundación de la población en cautiverio, en la cual puede por casualidad presentarse un alta y una baja frecuencia de alelos particulares.

Por otra parte, es relevante mencionar que las poblaciones muestreadas en este estudio, comparten algunos alelos encontrados en poblaciones silvestres de *C. moreletii* en Belice (Dever *et al.*, 2002). De estos alelos que resultaron similares para los dos estudios, es importante mencionar que cuando uno se encontraba en alta frecuencia para las poblaciones de las UMA, su frecuencia era mínima para las poblaciones de Belice y caso contrario, cuando la frecuencia era alta para un alelo en las poblaciones de Belice en las UMA se encontró como alelo privado o con una mínima frecuencia. Tal es el caso del alelo 190 para el locus Cj18, el cual se encuentra en altas frecuencias para todas las poblaciones de Belice y, al contrario, en este estudio solo se presenta como alelo privado para la población del CICEA. Por el contrario, el alelo 192 del mismo locus se presenta en baja frecuencia para solo dos poblaciones de Belice y en las UMA muestreadas presenta una muy alta frecuencia para SF y es el alelo con la mayor frecuencia para LC y el CICEA. Otro locus que presenta algunos alelos iguales en las dos poblaciones es el Cj109, donde el alelo 368 que muestra una muy baja frecuencia en las poblaciones de Belice, es el que parece con mayor frecuencia para el mismo locus, en las tres poblaciones de esta investigación. Otros alelos compartidos de este mismo locus son el 362 y el 370, el alelo 362, se presenta con la mayor frecuencia para ese locus en todas las poblaciones de Belice y en muy baja frecuencia para las poblaciones muestreadas. Para el locus Cj20 se encontraron los alelos 149,171,153 y 173, estos también variaron en frecuencia entre los dos estudios, sin embargo, cabe señalar que, en las poblaciones en cautiverio 3 de estos alelos se presentaron como alelos privados (171 para el CICEA, 173 para LC y 153 para SF). Estas similitudes en los alelos, sugiere que

existe una relación entre las poblaciones de las UMA de *C. moreletii* muestreadas y las poblaciones de la misma especie en vida libre de Belice, de tal manera que es posible que en algún momento estas poblaciones, al tener históricamente un amplio rango de distribución natural (Álvarez del toro y Singler, 2001), haya existido un flujo de genes entre las mismas y por lo tanto es probable que estas poblaciones mantengan algunas similitudes en la información genética.

Para los siete loci estudiados, el número promedio de alelos por locus para cada población fue de cuatro para La Colorada, 4.71 para San Fernando y 5.42 para la población del CICEA, el promedio para la población total fue de 4.7 alelos por locus. El número promedio de alelos para las tres poblaciones en cautiverio es similar al obtenido por Rodríguez *et al.* 2008 en vida libre para la misma especie (4.5 alelos por locus), con el empleo de 10 microsatélites, entre ellos seis de los utilizados en este estudio. Del mismo modo, Gonzales-Trujillo en 2012 reportó un promedio de 3.67 alelos por locus para *C. moreletii* en poblaciones silvestres usando nueve microsatélites (seis incluidos en este estudio). Asimismo, Bashyal *et al.* en 2014, obtuvieron un promedio de cuatro alelos por locus para la misma especie en poblaciones silvestres utilizando marcadores desarrollados para *C. porosus*. De la misma manera, el número de alelos encontrados para cada locus por cada población, es similar a los encontrados en otros estudios para la misma especie (Dever y Densmore 2001; Dever *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2008; Gonzales-Trujillo *et al.*, 2012), donde se han utilizado seis o siete de los microsatélites empleados en este estudio.

Los valores de  $H_o$  obtenidos para cada población (0.907 para SF, 0.875 para La Colorada y 0.895 para el CICEA), son más altos que los reportados para otras poblaciones de la misma especie. Bashyal *et al.* (2014) reportaron una  $H_o$  de 0.76 y 0.70 para poblaciones silvestres de *C. moreletii* en Belice y México respectivamente. De igual manera Gonzales-Trujillo *et al.* (2012) obtuvieron valores bajos de  $H_o$  (0.32) para poblaciones en vida libre de la misma especie. Por su parte Serna-Lagunés *et al.* (2012) reportaron valores casi nulos de  $H_o$  para poblaciones en Cautiverio. En General los valores de  $H_o$  obtenidos para las tres poblaciones estudiadas, resultan altos en comparación con los valores obtenidos

para la misma especie (Dever et al., 2002; Rodríguez et al., 2008; Mc Vay *et al.*, 2008) u otras especies del género *Crocodylus* (Weber, 2008; Cuervo- Alarcón y Burbano Montenegro, 2012; Milián- García *et al.*, 2016).

Para las tres poblaciones hubo presencia de alelos privados en por lo menos un locus para cada población, estos alelos se presentaron en frecuencias relativamente bajas. Por lo cual, existe la posibilidad de que se pierdan en generaciones posteriores debido al efecto de la deriva génica (Cuervo- Alarcón y Burbano Montenegro, 2012).

Por otra parte, los alelos privados identificados podrían ser útiles para diferenciar las poblaciones en estudio, debido a la mínima diferenciación genética observada. Kalinowski (2004), sugiere que la riqueza alélica privada o el número de alelos privados en una población puede ser suficientemente informativa para distinguir una población de otras dentro de una misma especie. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que, usar los alelos privados como medida de diversidad entre poblaciones, es altamente dependiente de la muestra. Por lo tanto, muchos alelos que se muestran como privados pueden en realidad no serlo (Bashyal *et al.*, 2014).

El exceso de heterocigocidad observado por medio de los distintos índices de fijación ( $F_{is}$  y  $F_{it}$ ) en cada una de las poblaciones estudiadas (Pardo *et al.*, 2017), muestra que estas presentan una estructura casi homogénea. Asimismo, el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones fue muy bajo, pues el análisis de las distancias genéticas entre pares de poblaciones indica que solo existe aproximadamente de 3.5 a 3.7 % de diferenciación entre las poblaciones, por lo cual la diferencia entre las tres poblaciones es mínima para los marcadores estudiados y sugiere que todas ellas se llegan a comportar como una sola población (Pardo *et al.*, 2017).

Si las frecuencias observadas muestran una diferencia significativa con respecto a las frecuencias esperadas se dice que la población no está en EHW. La prueba de EHW muestra desviaciones en la mayoría de los loci para las tres poblaciones, este desequilibrio puede ser ocasionado por diversas causas, en este caso, los valores negativos para todos los marcadores en  $F_{it}$  y  $F_{is}$ , de acuerdo con (Pardo

*et al.*, 2017) es evidencia de un exceso en la heterocigocidad de los individuos con respecto a cada población y de los individuos con respecto a la población total y por lo tanto se asume la usencia de consanguinidad total. Lo anterior es consecuente con las desviaciones de las proporciones en el EHW.

Cornuet y Luikar (1996), sugieren que un exceso en la heterocigocidad puede ocurrir después de un reciente cambio en el tamaño efectivo de la población, pero también si los heterocigotos tienen una ventaja selectiva. Asimismo, mencionan que, cuando una población experimenta una reducción de su tamaño efectivo, generalmente desarrolla una heterocigocidad en exceso en loci selectivamente neutros, es decir la heterocigosidad a partir de una muestra de genes es mayor que la heterocigocidad esperada a partir del número de alelos encontrados en una muestra. Este exceso de heterocigotos persiste solo un cierto número de número de generaciones hasta que un nuevo equilibrio se establece.

De acuerdo con autores como Chavarro *et al.*, 2016, Wang 2014 y Pardo *et al.*, 2017, este exceso de heterocigotos, podría ser atribuido a la presencia de una selección sobredominante, de la cual una forma es la ventaja del heterocigoto, es decir que, cuando el heterocigoto es más eficaz puede ocurrir una selección a favor de estos individuos (Cornuet y Luikart, 1996). Esto supone que, aquellos individuos heterocigotos en estas poblaciones han tenido una ventaja selectiva logrando reproducirse con mayor éxito, y por lo tanto, han dejado una descendencia con variaciones en la información genética que les permite una mejor supervivencia al cautiverio (Christie *et al.*, 2012).

Los valores obtenidos para  $F_{st}$  fueron muy cercanos a cero, lo cual nos indica, que no hay una divergencia genética relevante entre las poblaciones. Por lo tanto, no existe una estructura poblacional definida, lo que indica que las tres poblaciones son similares para los marcadores estudiados. De igual modo, el análisis realizado por medio de STRUCTURE para determinar la estructura de la población, nos indica que el número óptimo de grupos diferentes es  $K=3$ . Sin embargo, en el clúster puede observar una estructura casi homogénea, pues cada individuo, que es representado por cada una de las barras verticales, tiene cierta probabilidad de pertenecer cualquiera de los 3 grupos. Estos resultados concuerdan con lo

descrito por Sena-Lagunes *et al.* 2012, quienes mencionan que la limitada diferenciación genética obtenida en poblaciones de *C. moreletii* en cautiverio, se debe a que las poblaciones iniciales fueron extraídas del rango de distribución natural, donde históricamente existía un flujo de genes y la especie se distribuían de forma continua. Por lo tanto, es posible que los alelos se hayan mantenido así desde entonces y tiendan a formar un grupo homogéneo con muy baja diferenciación entre las poblaciones de la misma especie.

Otra explicación a la falta de diferenciación en las poblaciones, puede ser la adaptación genética al cautiverio. Frankham *et al.* (2002), describieron la adaptación al cautiverio como uno de los cuatro principales cambios en la genética de las poblaciones cautivas. Esta adaptación, ocurre a través de un proceso de selección involuntaria, al ser los ambientes cautivos diferentes al medio silvestre, se requieren variantes genéticas que favorezcan la supervivencia en el nuevo ambiente. Es decir, aquellas variaciones que favorecían a los organismos en vida libre diferirán de las variaciones necesarias para el ambiente cautivo. Por lo tanto, es probable que aquellos alelos que permiten la supervivencia al cautiverio sean análogos para estas poblaciones, lo que supondría una similitud en la información genética entre estas UMA. Pues, de acuerdo Christie *et al.* (2012), todas las poblaciones silvestres contienen la variación genética necesaria para una rápida adaptación al ambiente cautivo y este sucede en unas cuantas generaciones, dependiendo de la especie, pues una característica inusual de los organismos cautivos, es que solo los primeros años las etapas de la historia de vida se mantienen en cautiverio.

La supervivencia de distintas especies, depende de la cría en cautiverio y una posible reintroducción al medio silvestre. Sin embargo, las poblaciones cautivas a menudo son pequeñas y están fundadas por un número limitado de organismos, por lo tanto, tienden a estar expuestas a los efectos negativos de cambios en la composición genética de sus poblaciones (Oliveira *et al.*, 2016). Frankham *et al.* (2002), mencionan la adaptación al cautiverio como uno de los principales cambios en la genética de las poblaciones en cautivas. Estos cambios, pueden generar diversos conflictos para la conservación de la especie y si se pretende llevar a cabo un



proceso de reintroducción al medio silvestre. Debido a esto, la atención para la reproducción en cautiverio debe centrarse no solo en producir la mayor cantidad posible de organismos, sino también en la retención de la mayor variabilidad genética posible dentro y entre las poblaciones, manteniendo así la integridad genética las mismas (Oliveira *et al.*, 2016).

Cuando se lleva a cabo una reproducción en cautiverio, se debe tomar en cuenta que, habrá algunos que se adaptarán mejor a este ambiente y por medio de un proceso de selección involuntaria, producirán una descendencia adaptada al cautiverio. Es decir, aquellos organismos nacidos en cautiverio, funcionarán mejor en cautiverio (Christie *et al.*, 2012). Esta adaptación al cautiverio, resulta en una problemática para la especie pues, los valores de rasgo asociados con el éxito en el ambiente cautivo son perjudiciales en la naturaleza, lo que resulta en un bajo éxito fuera del ambiente cautivo.

La implementación de la reproducción *ex-situ* por medio de las UMA, desde su inicio ha desempeñado un papel importante en la conservación de las especies en peligro de extinción, pues se ha logrado incrementar el número de organismos reproducidos en cautiverio, disminuyendo de esta manera la presión que ejerce la explotación ilegal en las poblaciones silvestres (Serna-Lagunes y Díaz-Rivera, 2011). Sin embargo, el papel de las UMA ha sido enfocado en su mayoría a obtener un gran número de individuos, sin tomar en cuenta la estructura genética de las poblaciones. Esta omisión podría generar conflictos a futuro, pues las poblaciones cautivas a menudo son fundadas por un número limitado de organismos, por lo cual, gran parte de la variación genética total de la población origen, no estará presente en estas poblaciones cautivas permitiendo que estas, queden expuestas a los efectos negativos de cambios en su composición genética, Por lo tanto, es importante señalar que contrario a los planes de reproducción para animales domésticos, los cuales generalmente están diseñados para cambiar la naturaleza genética de la población, para manejo de especies silvestres en cautividad, es necesario conservar mayor diversidad genética posible, disminuyendo así los posibles cambios en la naturaleza genética de las poblaciones. Sin embargo, para llevar a cabo este propósito, es necesario también

conocer la estructura genética de las poblaciones silvestres, ya que de este modo se tendrá un precedente de las poblaciones origen, lo cual permitirá evaluar los cambios ocurridos en las poblaciones cautivas. Es importante saber cómo cambian las poblaciones en cautiverio con respecto a las poblaciones silvestres, debido a que, al conformarse una nueva población cautiva, la presión de selección ocasionada por el ambiente nuevo ambiente, actuara generando cambios en las frecuencias alélicas de la población, poniendo en riesgo las capacidades de adaptación de dicha población. Esta capacidad de adaptación es importante para la supervivencia y adaptación de la población, y si, se pretende la reintroducción de organismos al medio silvestre. Debido a esto, es necesario conservar la mayor variación genética en las poblaciones cautivas y reducir al mínimo la adaptación al cautiverio, evitando así la pérdida de alelos, pues a pesar de los cambios en las frecuencias, si se mantienen las variaciones necesarias dentro de la población, es posible la supervivencia y reintroducción de organismos al medio silvestre.

Las reproducción en cautiverio se desarrollado en su mayoría sin tomar en cuenta la diversidad genética de las poblaciones, sin embargo, esta información es necesaria para la planificación de un correcto plan de manejo de dichas poblaciones, pues no se puede llevar a cabo el rescate de una especie basándose solo en el incremento en el número de organismos, pues aun una gran población con una mínima variación genética, puede extinguirse si no cuenta con las variaciones necesarias para adaptarse a los cambios ambientales. Por lo tanto, para la conformación de una nueva población en cautiverio, se debe contemplar desde un inicio la información genética de los fundadores, procurando que el parentesco entre estos sea mínimo, además se debe tener conocimiento de la composición genética de la población origen, para de esta manera poder tener un punto de partida, que permita determinar que tanto ha cambiado la población cautiva con respecto a la silvestre. En el caso de poblaciones ya establecidas, es recomendable realizar un diagnóstico, para determinar el estado genético de las mismas y conocer la información genética referente a los individuos que han contribuido a la conformación de las poblaciones actuales, la variación genética existente en la población y el grado de relación entre los individuos que la

conforman. Pues, es probable que estas poblaciones se establezcan sin conocer la relación que existe entre los organismos fundadores. De esta manera, el contar con esta información permitirá una mejor gestión en la toma de decisiones para mantener la viabilidad de la población a largo plazo. En caso de que ya exista algún problema derivado de cambios en la composición genética de las poblaciones, es importante conservar la variación genética que aún queda dentro de las mismas o en dado caso tratar de incrementarla. Esto podría ser posible, asegurándose que los organismos que se están reproduciendo posean el mínimo de parentesco entre sí. Del mismo modo, el intercambio de organismos entre UMA, es una opción viable para la adición de nuevos alelos a la población.

Una reintroducción de individuos provenientes de un ambiente cautivo podría ser posible, si se cuenta con la información genética necesaria para llevar a cabo este fin. En primera instancia, es necesario tener certeza de que los organismos destinados para este fin no sean hibridaciones de otras especies, así mismo, es necesario conocer las relaciones presentes entre los organismos de la población además su variación genética. La reintroducción podría llevarse a cabo en áreas donde se tiene conocimiento que la especie se distribuyó de forma natural.

### **3.18 Conclusiones**

- 1.- Los microsatélites desarrollados para *C. Jhonsoni* pueden usarse de forma confiable para estudios de la variabilidad genética en *C. moreletii* ya que mostraron un número amplio de polimorfismos, similar a lo reportado en otros trabajos.
- 2.- La variabilidad encontrada en las tres poblaciones evaluadas sugieren un exceso de heterocigosidad, contrario a lo que se esperaba en poblaciones en cautiverio (exceso de endogamia).
- 3.- No existió una diferenciación marcada entre las poblaciones, lo cual indica que estas podrían derivarse de una misma población o podría tratarse de adaptaciones al cautiverio.
- 4.- Si bien el análisis de estructura y variabilidad genética mostró similitud entre las poblaciones, la existencia de alelos privados sugiere que las poblaciones

comienzan a diferenciarse, esto en un futuro podría generar poblaciones subestructuradas.

5.- El análisis genético llevado a cabo en la tres UMA sugieren que han ocurrido eventos de adaptación al cautiverio, lo que genera que las poblaciones cautivas sean muy similares. Esto generaría un riesgo si se considera que la intención de las UMA es proporcionar animales para la reintroducción.

### 3.19 Literatura citada

- Alejos, L., C. Aragón y A. Cornejo. (2014). Extracción y Purificación de ADN. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, SEMARNAT, pp.1-25.
- Álvarez del Toro, M. y L. Singler. 2001. Los Crocodylia de México 1ª Edición. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C. México, PROFEPA. 134 p.
- Álvarez-Romero, J.G., R.A. Medellín, A. Oliveras-Ita, H. Gómez-de Silva y O. Sánchez. 2008. Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, UNAM. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México D. F., 518pp.
- Aranguren-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 13(1): 1-6.
- Bashyal, A., Gross B., Venegas-Anaya M., Lowrance F. y Densmore D. 2014. Assessment of microsatellites in estimating inter- and intraspecific variation among Neotropical *Crocodylus* species. Genet. Mol. Res. 13 (3). 5492-502.
- Bishop, M.J., A.J. Leslie, S.L. Bourquin y C.O'Ryan. 2009. Reduced effective population size in an overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). Biol. Conserv. 142: 2335-2341.
- Casas-Andreu, G. 1995. Los cocodrilos de México como recurso natural. Presente, Pasado y Futuro. Instituto de Biología, UNAM. 9pp.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios y R. Macip. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. Rev. Mex. Biodiv. Vol. 82 No. 1 México.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios, A. Escobedo-Galván y X. Aguilar-Miguel. 2013. Sinopsis de datos biológicos y ecológicos del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México. pp: 63.
- Cedillo-Leal, C., J.C. Martínez-González, F. Briones-Encina y E. Cienfuegos-Rivas. 2011. Importancia del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en los humedales costeros de Tamaulipas, México. CienciaUat. 21.3:18-23.
- Chavarro, C. F. G., M. E. L. Lozano, A. C. M., E. I. Ochoa, Y. M. Coronado, 2016. Caracterización molecular de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., procedente

de diferentes orígenes (Zaire y Camerún) usando marcadores microsatélites. *Act. Agron.* 65:3. 276-283.

Christie M.R., M.L. Marine, R.A. French, M.S. Blouin. 2012. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109:238–42.

Cornuet, J. M., & G. Luikart, (1996). Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks from Allele Frequency Data. *Gen.* 144(4), 2001–2014.

Cuervo-Alarcón, L. C. y C. Burbano-Montenegro. 2012. Caracterización genética de la población *ex situ* de *Crocodylus intermedius* presente en Colombia. *Rev. de la Academ. Colom. de Cienc. Exac. Físic. y Nat.* 36: 373-383.

Davis, L. M., T. C. Glenn, R. M. Elsey, I. L. Brisbin Jr, W. E. Rhodes, H. C. Dessauer, & R. H. Sawyer. (2001). Genetic structure of six populations of American alligators: a microsatellite analysis. *Croc. Biol. and Evol.*, 38-50.

Díaz, A., Li., Flores, J., Aportela, E., Sierra. (2014). PCR :Reacción en cadena de la polimerasa. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, SEMARNAT, pp.53-73.

De Thoisy, B., T. Hrbek, I.P Farias, W.R. Vasconcelos, A. Lavergne. 2006. Genetic structure, population dynamics, and conservation of black caiman (*Melanosuchus niger*). *Biol. Conserv.* 133:474–482.

Dever, J. A. and L. D. Densmore. 2001. Microsatellites in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) and Their Utility in Addressing Crocodylian Population Genetics Questions. *Journal of Herpetology*, 35.3: 541-544.

Dever, J. A., Strauss, R. E., Rainwater, T. R., McMurry, S. T., & Densmore, L. D. (2002). Genetic Diversity, Population Subdivision, and Gene Flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia*, 2002. 4: 1078–1091.

Earl, Dent A. and vonHoldt, M. Bridgett. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 .2: 359-361

Eguiarte, L., V. Souza, X. Aguirre, 2007, Ecología Molecular. Herramientas moleculares. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM, México, 542-557.

Escobedo-Galván, A.H. 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.

Evanno et al., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molec. Ecol.* 14 : 2611 – 2620.

Fierro F. 2014. Electroforesis de ADN. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, SEMARNAT, pp.27-51.

- Fitzsimmons, N.S. Tanksley, M. R. Forstner, E. E. Louis, R. Daglish, J. Gratten, and S. Davis. 2000. Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. In G. Grigg, E. Seebacher, and C. E. Franklin (eds.), *Croc. Biol. and Evol.* pp. 51-57.
- Fitzsimmons N.N., J.C. Buchan, P.V. Lam, G. Polet, T.T. Hung, N.Q. Thang, J. Gratten. 2002. Identification of Purebred *Crocodylus siamensis* for Reintroduction in Vietnam. *J. of Exp. Zoo.* 294:373–381.
- Flint, N.S., F.H. Van der Bank y J.P. Grobler. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA Vol. 26 (1):* 105-110.
- Frankham, R., D. A. Briscoe, and J. D. Ballou. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- Gallina-Tessaro, S.A., A. Hernández-Huerta, C.A. Delfín-Alonso y A. González-Gallina. 2009. Unidades para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre en México (UMA). Retos para su correcto funcionamiento. *Rev. INE. Invest. Amb.* 1(2):143-152.
- Glenn T.C., H.D. Dessauer, M.J. Braun (1998) Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. *Copeia* , 591–601.
- Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosist. Esp.* ISSN: 18(1):23-33.
- González-Trujillo R., D. Rodriguez, A. González-Romero, M.R.J. Forstner, L.D. Densmore III., V. H. Reynoso (2012) Testing for hybridization and assessing genetic diversity in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) populations from central Veracruz. *Conserv. Gen.* 13: 1677–1683.
- Gordillo-Chávez, J.E. 2013. Evaluación de la UMA de cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Licenciatura en Biología. 53pp
- Hedrick P.W. 2001. Conservation genetics: where are now? *Trends.Ecol.Evol.* 16:629-636.
- INE. 2000. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los *Crocodylia* de México (COMACROM). Instituto Nacional de Ecología y Secretaria de Marina y Recursos Naturales, Distrito Federal, México.
- Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.* 19. 4: 333-341.
- Isberg S.R, Chen Y, Barker S.G, Moran C (2004). Analysis of Microsatellites and Parentage Testing in Saltwater Crocodiles. *J. of Hered.* 95. 5: 445-449.

- Jacobson, E., R. 1984. Immobilization, blood sampling, necropsy techniques and diseases of crocodylians: a review. *The Journal of Zoo Animal Medicine*. 15; 38-45.
- Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y uso en los programas de conservación. *Invest. Agríc., Sist. y Rec. Forest.* 2: 237-248.
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genet.* 5: 539–543.
- Luikart, G., W.B. Sherwin, B.M. Steele, F.W. Allendorf. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molec. Ecol.* 7:963-974.
- Mace, G.M., & Purvis, A. 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molec. Ecol.* 17:9-19.
- Martínez, S. A. 2008. Métodos actuales de identificación individual en reptiles. *Aprendiendo sobre reptiles. Animalia.* 211. 242-243.
- McVay, J. D., D. Rodríguez, T. R. Rainwater, J. A. Dever, S. G. Platt, S. T. McMurry, R.J. Forstner, L. D. Densmore III, (2008). Evidence of multiple paternity in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, inferred from microsatellite markers. *J. of Exp. Zool. Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309.10: 643-648.
- Miles, L. G., S. L. Lance , S. R. Isberg, C. Moran, T. C. Glenn. 2008. Cross-species amplification of microsatellites in crocodylians: assessment and applications for the future. *Conserv. Gen.* 10.4: 935–954.
- Milián-García, Y., Venegas-Anaya M., Frias-Soler R., Crawford A. J., Ramos-Targarona R., R. Rodríguez-Soberón, A. Tobet , J. Thorbjarnarson, S. Oi E. Bermingham, 2011. Evolutionary history of Cuban crocodiles *Crocodylus rhombifer* and *Crocodylus acutus* inferred from multilocus markers. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315A.6: 358–375.
- Newsletter Microbial. 2009. <http://www.microbial-systems.com>
- Oliveira P.R.R., M.C. Costa, L.F. Silveira, M.R. Francisco. 2016. Genetic guidelines for captive breeding and reintroductions of the endangered Black-fronted Piping Guan, *Aburria jacutinga* (galliformes, cracidae), an Atlantic Forest endemic. *Zoo. Biol.* 35:313–8.
- Padilla, S. E., M. Weber, E. Jacobson 2009. Comparación de anticoagulantes de heparina de litio y sodio en la bioquímica plasmática del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletti*) en Campeche, México. *Vet. Méx.* 40: 203-211.



- Pardo, E., L. Causil, B. Muñoz. 2017. Perfil Genético de la Población de Gatos (*Felis catus*) en Riohacha, La Guajira, Mediante Genes de Pelaje. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13. 2: 128-132.
- Pritchard, Stephens, Donnelly. 2000. *Genetics* 155:945-959. [STRUCTURE](#).
- Robles-de Benito, R. 2009. Las unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre y el corredor Biológico Mesoamericano, México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, Seri Acciones, No. 2, 130pp.
- Rodríguez, D., J.R. Cedeño-Vázquez M.R.J. Forstner, L.D. Densmore. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: II. Evidence from microsatellites. *J. Exp. Zool.* 309A:674–686.
- Ross, J. P. 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2<sup>nd</sup> Edition. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK pp: 96
- SEMARNAT. 2009. Manual técnico para beneficiarios: Manejo de vida silvestre Primera Edición. México.
- SEMARNAT. 2013. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México.
- Sanchez, J. 2001. Estado de la población de cocodrilos (*Crocodylus acutus*) en el río Tempisque Guanacaste Costa Rica. Informe Final. Área de Conservación Tempisque. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica, 49 pp.
- Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajauregui, A. García-Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez-Díaz. 2011. Programa de monitoreo del Cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). México, Belice, Guatemala. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 270 pp.
- Schlötterer, C. (2000). *Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma*, 109.6: 365–371.
- Serna-Lagunes, R. 2010. Historia de vida y genética cuantitativa de cuatro poblaciones de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) bajo condiciones de cautiverio en el trópico mexicano. Maestría en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados. México Veracruz. 111 pp.
- Serna-Lagunes, R. y P. Díaz-Rivera. 2011. Variación genética y conservación de una población de *Crocodylus moreletii* en cautiverio. *Act. Zool. Mex.* 27.3 : 547-56.
- Serna-Lagunes, R., D. González y P. Díaz-Rivera. 2012. Variabilidad genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae)

mediante el uso de marcadores microsatelitales. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 60. 1: 425-436.

Troiano, J. C. 2013. Colecta de Muestras Sanguíneas en Reptiles. Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional. Colombia.

Vendramin, G. G., L. Lelli, P. Rossi, & M. Morgante. 1996: A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595-598.

Wang, J. 2014. Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. *J. of Evol. Biol.* 27(3), 518-530.

Weaver, J.P., D. Rodríguez, M. Venegas, J.R. Cedeño, M.R. Forstner & L. D. Densmore. 2008. Genetic characterization of captive Cuban crocodiles (*Crocodylus rhombifer*) and evidence of hybridization with the American crocodile (*Crocodylus acutus*). *J. Exp. Zool. A, Ecol. Genet. Physiol.* 309, 649–660.

Xu Q.H., S.G. Fang, Z.P. Wang y Z. Wang. 2005. Microsatellite analysis of genetic diversity in the Chinese alligator (*Alligator sinensis*) Changxing captive population. *Conserv Genet* 6:941–951.

Zucoloto, R.B., P.M.V. Schimidt, L.M. Verdade y L.L. Coutinho. 2006. Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman spp.* and *Paleosuchus palpebrosus*). *Genet. Mol. Biol.* 29: 75-78.

## CAPÍTULO 4. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA.

### 4.1 Resumen

Los constantes cambios en los hábitats naturales, propiciados en su mayoría por actividades antropogénicas, ha traído consigo la acelerada disminución de las poblaciones silvestres, lo cual hace cada vez más complicado su manejo. En el caso de los cocodrilos, muchas poblaciones han disminuido hasta llegar al borde de la extinción por lo cual, se han desarrollado diferentes estrategias para su conservación. Una de las más relevantes ha sido la reproducción en cautiverio, sin embargo, esta actividad en su mayoría se ha centrado solo en la reproducción de un gran número organismos sin tomar en cuenta la importancia de los procesos evolutivos, pues con frecuencia la conformación de una población *ex-situ*, se realizan en ausencia de la información genética necesaria. Es necesario conocer la estructura genética de las poblaciones fundadoras para de esta manera poder diseñar programas de manejo adecuados que aseguren la viabilidad de las poblaciones manteniendo la habilidad de los organismos a adaptarse y evolucionar hacia nuevas circunstancias. Por lo tanto, es necesario conocer las bases para llevar a cabo estudios de Variabilidad Genética, por lo cual se desarrolló un manual que expone de manera general la realización de un estudio con marcadores microsátélites en cocodrilos. Este manual proporciona información necesaria para la correcta manipulación de los organismos, la obtención de muestras biológicas, información acerca de los microsátélites desarrollados para diversas especies de cocodrilos e incluye una sección de apoyo para el análisis de los datos.

### 4.2 Introducción

Los programas de cría en cautiverio, se pueden considerar exitosos pues el número de organismos se ha logrado incrementar considerablemente, sin embargo, es común que, al establecer estos sistemas, no se tome en cuenta la naturaleza genética de la población, pues esta industria se ha basado principalmente en la reproducción y cría de cocodrilos, cuya finalidad principal es

el comercio de piel, carne y otros derivados de estos organismos (Serna-Lagunes, 2010).

En general la explotación irracional de estos animales afecto la mayoría de sus poblaciones y esto genero graves cambios en la demografía poblacional, lo cual suele afectar la estructura genética de la misma y si a esto, se añade el cambio necesario para la adaptación al cautiverio, las poblaciones resultantes podrían ver afectada su supervivencia a largo plazo, además, si se pretende la reintroducción de organismos al medio silvestre, es necesario determinar, conocer y monitorear la variabilidad genética, pues no contar con la información necesaria para determinar los criterios de selección para posibles candidatos a reintroducción, podría afectar seriamente las poblaciones silvestres. Así mismo, se deben prevenir problemas relacionados con la endogamia u otros cambios en la estructura genética, tanto de las poblaciones silvestres como de aquellas que se encuentran en cautividad, ya que es necesario que las crías nacidas *ex-situ* posean las variaciones necesarias para que puedan resistir y adaptarse a las presiones ambientales del hábitat en el que podrían ser liberadas (FitzSimmons *et al.*, 2002).

### 4.3 Antecedentes

Los efectos antropogénicos se ven prácticamente en todos los ecosistemas de la tierra, dando como resultado la fragmentación y perdida de los hábitats, lo cual hace que el manejo de las poblaciones naturales sea cada vez más complicado y que estas disminuyan a un ritmo acelerado. Desafortunadamente, los recursos biológicos requieren cada vez más de la intervención y gestión humana para su persistencia. Debido a esta situación, las especies deben tener la capacidad responder a las presiones selectivas impulsadas por alteraciones en ambiente (Ashley, 2001). En cocodrílidos como en diferentes especies, las poblaciones se han visto claramente afectadas debido estos cambios, por lo cual han surgido diferentes estrategias de conservación siendo la reproducción en cautiverio una de las más relevantes (Casas-Andreu *et al.*, 2011). Sin embargo, esta estrategia surgió de la necesidad de continuar explotando el recuso, por lo tanto, estos sistemas se han centrado solo en incrementar el número de organismos para la comercialización de sus pieles y derivados (Serna-Lagunes, 2010), dejando de

lado la importancia de los procesos evolutivos, pues es con frecuencia la conformación de una nueva población *ex-situ*, se realizan en ausencia de la información genética necesaria (Mace y Purvis, 2008).

En México, el aprovechamiento *ex-situ* se otorga mediante esquemas de producción, conservación, manejo y aprovechamiento denominados Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), donde uno de los principales objetivos, es la conservación y liberación de individuos a su hábitat natural, con la finalidad de recuperar poblaciones silvestres en el futuro (Serna-Lagunes *et al.*, 2012). Si bien un ideal conservacionista de devolver las especies y los ecosistemas a su estado inicial es poco realista, es fundamental mantener la habilidad para que los organismos sigan adaptándose y evolucionando hacia nuevas circunstancias (Mace y Purvis, 2008) , pues al ser el las condiciones en cautividad un ambiente claramente diferente, se crean una selección de rasgos que difieren de los favorecidos en poblaciones silvestres, lo que conduce a poblaciones que no son adaptables fuera de su entorno nativo, por lo tanto, al constituir una nueva población se debe conocer la estructura genética de las poblaciones fundadoras para de esta manera poder diseñar programas de manejo adecuados que aseguren la viabilidad y supervivencia a largo plazo de las mismas, promoviendo objetivos tanto evolutivos como ecológicos, pues a pesar de que los cambios evolutivos han tomado relevancia como un componente clave en la conservación y planificación ambiental, ha sido complicado ponerlo en práctica (Ashley, 2001).

## **Objetivo**

Este manual tiene como fin proporcionar la información necesaria para la correcta manipulación, toma de datos morfométricos, sexado, obtención y manipulación de muestras biológicas de cocodrilídeos confinados, para estudios de análisis de la estructura y variabilidad genética por medio de marcadores moleculares, incluye una sección de apoyo para el análisis de los datos por medio de programas informáticos especializados.

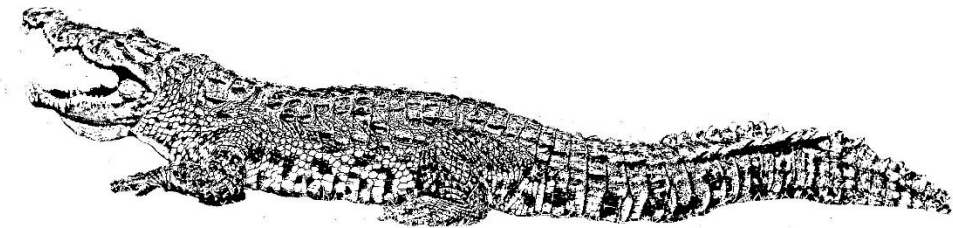
#### 4.5 Descripción de actividades

1. Como parte de las actividades correspondientes a la transferencia de tecnología para la Maestría en Ecología Aplicada se contactó con al menos 6 UMA dedicadas a la reproducción de cocodrilos, de las cuales solo 3 permitieron el planteamiento de la investigación. Una vez hecho esto, se llevó a cabo el acercamiento con el encargado de cada una de las UMA para exponer el propósito y los objetivos del proyecto, explicando la importancia de este tipo de estudios para la viabilidad a largo plazo de las poblaciones.
2. La segunda parte consistió en la toma de muestras, donde se informó a los alumnos de la UAJT sobre la importancia de las actividades a realizar y el propósito de la investigación. De la misma manera se transmitió la información al personal de la UMA La Colorada y San Fernando.
3. Cuando se realizó el planteamiento de la investigación en cada una de las UMA se acordó como transferencia de tecnología, hacer llegar a cada lugar los resultados obtenidos y un diagnóstico de situación. Estos resultados fueron enviados vía correo electrónico a cada uno de los encargados de las respectivas UMA. Para el caso particular del CICEA la transferencia de tecnología se llevó a cabo por medio de una plática dirigida a las personas involucradas en dicha UMA.
4. Por último como parte de la transferencia de tecnología y como respuesta a diversas dudas sobre los estudios de Variabilidad Genética, se desarrolló un manual donde se expone de manera general la realización de un estudio de con microsátélites en cocodrilos.

4.6 manual

# MANUAL PARA EL ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN COCODRILOS, USANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES.

Santana Trinidad Gustavo Wolf.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

## Introducción

El manejo de las poblaciones naturales es cada vez más complicado y estas disminuyen a un ritmo acelerado, a causa de la fragmentación del hábitat, contaminación, explotación ilegal etc. Además de que existe una gran diversidad de cambios y factores involucrados en la supervivencia de las especies. Debido a esta situación, se ha optado por la conservación y reproducción de especies en cautiverio, lo cual ha resultado conveniente para incrementar el número de organismos de diversas especies fuera de su hábitat (Serna-Lagunes, 2010),. Sin embargo, al conformar una nueva población *ex-situ*, generalmente no se toma en cuenta la composición genética de la población origen, por lo tanto, no se conocen las variaciones genéticas, ni la relación entre los organismos fundadores de esta nueva población. De esta manera, el desconocimiento de esta información pone en riesgo la viabilidad a largo plazo de estas poblaciones, ya que los cambios en la composición genética, son de suma importancia para la conservación de las especies. Por lo tanto, el estudio de la variación existente, entre y dentro de los individuos de una población es fundamental para llevar a cabo una valoración que permita establecer planes de manejo adecuados para cada población y de este modo asegurar su supervivencia a largo plazo.

Los cocodrilidos, son especies de gran importancia para los ecosistemas en los que habitan pues aportan diversos beneficios, ecológicos al ecosistema y económicos a las poblaciones humanas (Cedillo-Leal *et al.*, 2011), sin embargo, como otras especies, han sufrido una gran disminución en sus poblaciones, debido principalmente a la destrucción de sus hábitats. Además, estas especies, han tenido que soportar la explotación comercial irracional para la obtención de sus pieles y otros derivados, lo que provoco, que muchas de sus poblaciones fueran mermadas llevándolas incluso a desaparecer de zonas donde su distribución era común, al punto de que varias de estas especies llegaran al borde de la extinción (Sánchez- Herrera *et al.*, 2011). Como respuesta a esta disminución en las poblaciones, surgieron diversas estrategias de Conservación para estas especies, siendo la reproducción en cautiverio una de las más relevantes (Casas-Andreu *et al.*, 2011). En algunos países esta estrategia surgió



de la necesidad de continuar explotando el recurso, debido a esto, la reproducción en cautiverio se ha concentrado solo en incrementar el número de organismos para la comercialización de sus pieles y derivados, dejando de lado la importancia de mantener la naturaleza genética de las poblaciones.

En México, la situación no fue diferente pues al no existir una regulación específica para el comercio de la piel de cocodrilo, la explotación excesiva de este recurso, ocasionó que las poblaciones de cocodrilos, se redujeran llevándolos a estar en una situación de alto riesgo de desaparecer del medio silvestre (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011). Debido a esta situación, se estableció una veda permanente para las tres especies de cocodrilos que se encuentran en el país, lo cual fortaleció las cadenas de aprovechamiento ilegal para estas especies, por lo que los antiguos beneficiarios del uso legal del recurso, solicitaron permisos de aprovechamiento promoviendo así el establecimiento de criaderos intensivos con fines comerciales y de conservación (INE, 2000). En México el orden Crocodylia está representado por tres especies: *Crocodylus acutus* (cocodrilo de río), *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano) ambos de la familia Crocodylidae; y el *Caiman crocodylus chiapasius* (caimán) de la familia Alligatoridae. Actualmente las tres especies se encuentran en alguna categoría de riesgo, entre las cuales son catalogadas como sujeta a protección especial y/o dependiente de conservación (IUCN 2010; NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010). Hoy en día, el aprovechamiento *ex-situ* se otorga mediante esquemas de producción, conservación, manejo y aprovechamiento denominados Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), donde uno de los principales objetivos, es la conservación y liberación de individuos a su hábitat natural, con la finalidad de recuperar poblaciones silvestres en el futuro (Serna-Lagunes *et al.*, 2012).

A pesar de que los cambios evolutivos han tomado relevancia como un componente clave en la conservación y planificación ambiental, ha sido complicado llevarlo a la práctica (Ashley, 2001). Sin embargo, para poder asegurar la viabilidad de las poblaciones en cautiverio a largo plazo, se deben desarrollar programas de manejo que se basen en la información de la estructura genética de las poblaciones, promoviendo de esta manera objetivos tanto evolutivos como

ecológicos. Por lo tanto, este manual proporciona la información general para la correcta manipulación, toma de datos, sexado, obtención y manipulación de muestras biológicas de cocodrilidos confinados, para estudios de análisis de la estructura y variabilidad genética por medio de marcadores moleculares, incluye una sección de apoyo para el análisis de los datos por medio de programas informáticos especializados.

## **Contención de organismos**

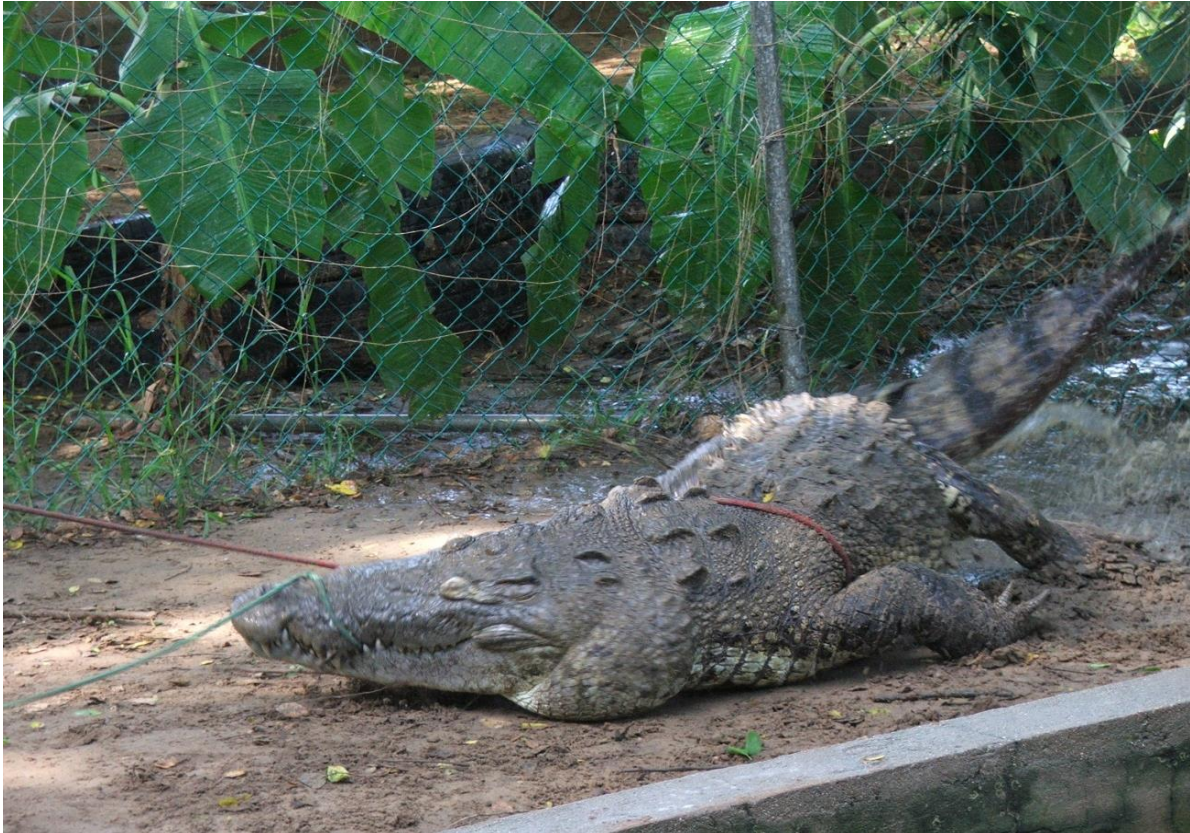
Los cocodrilos que se mantiene en cautiverio, son destinados a diversos tipos de encierro, dependiendo del tamaño, edad o finalidad de cada uno. Cuando se pretende realizar algún tipo de manipulación, esta se deberá hacer de manera rápida y eficaz para evitar que el organismo se estrese de más, tomando en cuenta siempre la seguridad tanto del animal como del manejador.

El primer paso, para la obtención de material biológico en cocodrílidos (Tejido o Sangre), es la contención del organismo, el método a seguir dependerá mucho del tamaño del animal y el lugar en el que este se encuentre. Los cocodrilos que se mantiene en cautiverio, son destinados a diversos tipos de encierro, dependiendo del tamaño, edad o finalidad de cada uno. La contención química en reptiles se hace compleja debido a su metabolismo lento y a la dependencia existente entre el animal y la temperatura ambiental (Rojas, 2002). Por lo que es poco recomendable el uso de esta en cocodrílidos, debido a que estos presentan un sistema circulatorio y excretor relativamente simple, en consecuencia, responden lentamente a la mayoría de las drogas y la recuperación resulta muy lenta, tomando incluso varios días para que el organismo pueda recuperarse por completo, por lo tanto, debe ser utilizada solo en ocasiones excepcionales (Jacobson, 1984). De tal modo, que la contención de un cocodrilo debe efectuarse de forma manual y de manera rápida y eficaz para evitar que el organismo se estrese de más, tomando en cuenta siempre la seguridad tanto del manejador como del animal. El tipo de manipulación requerida dependerá del objetivo de la misma, pues el manejo de un ejemplar puede ser por la limpieza de los encierros, traslado, reubicación, exploración clínica, toma de datos morfométricos, evaluación, alimentación forzada, entre otros. En caso de que se requiera la contención completa de un animal, es recomendable que se obtengan todos los datos necesarios en un solo manejo (Balderas *et al.*, 2014).

La captura y manipulación de cocodrilos requieren de experiencia, conocimiento, práctica, habilidad y paciencia. De tal modo, que cuando se pretende manipular un cocodrilo, se debe tomar en cuenta el riesgo que esta actividad puede representar tanto para el manejador como para el animal, además de prever todo aquello que

podría acontecer durante y posterior a la manipulación, esto con el fin de evitar cualquier tipo de accidente (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011). Por lo tanto, el manejo debe realizarse con sumo cuidado, de la forma más apropiada y los cocodrilos capturados deben ser inmovilizados, muestreados, marcados y liberados ilesos en el menor tiempo posible (Cherkiss *et al.*, 2005).

**Figura 4. Se muestra un cocodrilo sujetado por dos cuerdas, siendo halado fuera del agua para su manipulación.**



### **Material**

Material requerido basado en lo mencionado por Sánchez-Herrera *et al.*, en 2011.

#### **1. Cuerdas**

El uso de cuerdas de diferente grosor y longitud es una manera hasta cierto punto segura de manipular organismos, pues permite conservar una distancia razonable entre el manejador y el animal. Es necesario contar cuerdas de diámetros desde los 2 hasta 10 mm y longitudes desde los 5 hasta 10m para los diferentes diámetros. También, es recomendable tener cordones de menor longitud para lo que se pueda requerir. Del mismo modo, las cuerdas a utilizar deben ser lo

suficientemente pesadas para evitar que estas floten si son utilizadas bajo el agua (Figura 5).

**Figura 5. Cuerdas de diferentes tipos y diámetros utilizadas en la contención de los cocodrilos.**



## **2. Pértiga**

Una pértiga es un tubo o palo de madera u otro material de al menos 2m de largo, al cual cuenta con un lazo de acero o una cuerda, que permite tener un mayor alcance para lazar a un animal cuando este es muy agresivo o el terreno es accidentado. Una pértiga se puede armar con: un lazo de acero de entre 3/32" a 7/64", un seguro de tensión, un dispositivo de cierre, una cuerda de alta resistencia y un destorcedor. Para armar la pértiga, al lazo de acero se le coloca el seguro de tensión, el dispositivo de cierre y el destorcedor al cual se le asegura una cuerda por medio de un nudo resistente, posteriormente se monta en el tubo o palo con cinta adhesiva (Figura 3).



**Figura 6. Se muestra una pértiga conformada por: un tubo de aluminio, un seguro de tensión, un dispositivo de cierre, un destorcedor y un lazo de acero.**



### **3. Cinta adhesiva**

Es aconsejable tener a la mano cinta adhesiva de electricista, pues puede resultar muy útil como apoyo en diferentes situaciones, ya sea al armar una pértiga, para cubrir los ojos del organismo, cerrar la mandíbula e incluso contener animales pequeños si no se cuenta con cuerdas.

### **4. Ligas**

Los cocodrilianos cuentan con músculos sumamente fuertes para el cierre de sus mandíbulas, sin embargo, no poseen la misma fuerza para abrirla. Por lo tanto el uso de ligas de hule de diversos tamaños es suficiente para mantener la mandíbula cerrada durante la manipulación. Del tal modo que, para organismos de hasta 1.20, las ligas comerciales (2cm) suelen ser suficiente y para organismos de mayor tamaño, es recomendable fabricarlas de cámaras de llanta de desecho, ya sea de automóvil o bicicleta, de este modo se tiene la ventaja que pueden ser cortadas al tamaño que se requiera (Figura 4).

**Figura 7. Diferentes tipos de ligas utilizados para el cierre de mandíbula en cocodrilos.**



### **5. Trozo de tela**

Un trozo de tela servirá para cubrir los ojos y oídos del cocodrilo durante la captura y mientras dure el manejo, con esto se busca disminuir el estrés por el que pasa el animal manipulado.

### **6. Palo de madera**

Tener a la mano un palo de madera, puede ser de gran utilidad para cualquier eventualidad que se presente durante el manejo como: mantener alejados a otros cocodrilos, recuperar una cuerda, aflojar un nudo etc. El palo debe ser de madera, pues de este modo resulta ligero y fácil de manejar, además, si este es mordido no lastimara al animal.

## **Recomendaciones**

**Antes de llevar a cabo cualquier tipo de manejo es necesario:**

**1. Evaluar el tamaño del ejemplar, de esto dependerá el método a seguir.**

Es importante hacer un aproximado del tamaño del organismo, pues de este modo se puede seleccionar el grosor de las cuerdas, el tamaño de las ligas y el número de personas que pueden intervenir.

**2. Contar con el equipo necesario y revisar que este se encuentre en buen estado.**

Revisar constantemente el equipo necesario para llevar a cabo la captura del organismo es indispensable, pues es común que este llegue a dañarse durante los manejos. Una cuerda con una pequeña rasgadura podría reventarse y provocar un accidente al realizar la manipulación del animal.

**3. Determinar la ubicación del animal.**

Generalmente cuando un cocodrilo se siente amenazado, este buscará refugio en el agua, lo que dificultará la ubicación del ejemplar ya que en algunos casos la visibilidad del manejador está limitada a la superficie debido a la turbidez del agua o el exceso de vegetación, por lo que será necesario ayudarse de la cuerda o un palo para ubicar al animal sumergido.

**4. Definir perfectamente el objetivo de la captura.**

Se debe tener perfectamente definido el objetivo por el cual se manipulará el animal, esto con el fin de no exceder el tiempo de manejo y evitar contratiempos.

**5. Personal de apoyo**

La manipulación adulto grande requiere de más de una persona para su contención, por lo que antes de realizar el manejo se debe si tomar en cuenta el número de personas disponibles para apoyar en el manejo.

## **Recomendaciones antes, durante y después del manejo**

1.- Se debe llevar a cabo la planeación del manejo y determinar el número de personas que intervendrán durante el mismo, asignando la tarea que le corresponderá a cada uno.

2.- Nunca se debe tener la confianza plena en el control de un animal, ya que este buscara siempre la forma de liberarse.



- 2.- Las cuerdas pueden llegar a rasgarse con el filo de los dientes o las quillas del cocodrilo, si esto sucede es preferible cortar la cuerda en ese punto, pues esta podría reventarse durante la manipulación exponiendo al manejador.
- 3.- El cocodrilo debe ser manipulado siempre en la tierra, si este se encuentra en el agua será necesario lazarlo y llevarlo a tierra.
- 4.- Dentro de las posibilidades de debe llevar al cocodrilo a un espacio que permita el movimiento libre a quién o quienes estén llevando a cabo el manejo.
- 4.- La mandíbula es la parte más peligrosa de un cocodrilo y aun cerrada puede causar mucho daño, pues el cocodrilo tiende a cabecear hacia los lados, por lo que se debe tener precaución para evitar alguna lesión.
- 5.- Cuando se sostiene la mandíbula, es necesario sujetar firmemente y no confiarse, pues cualquier distracción y cambio en la presión permitirá que el animal se sienta libre y comenzará a moverse bruscamente.
- 6.- Nunca se debe permitir que un cocodrilo se caliente en exceso, en ocasiones el durante un manejo el sol comienza a irradiar directamente sobre el cocodrilo, en estos casos es necesario moverlo a un sitio donde haya sombra.
- 7.- Es preferible no manejar hembras en periodo de reproducción, pues la manipulación podría interferir con el mismo.
- 8.- Se recomienda que durante la contención sea colocado un trapo húmedo alrededor de los ojos y oídos del cocodrilo.
- 9.- Los cocodrilos que han sido manipulados cualquiera que fuese la cantidad de tiempo, requieren de un periodo recuperación, por lo que se les debe permitir recuperarse el tiempo que necesario y estar monitoreando cualquier anomalía durante este proceso.
- 10.- Una vez terminada la contención se debe revisar el área donde esta se llevó a cabo, en busca de sobrantes o desechos que pudieran haberse generado durante el manejo ya que el o los animales podrían ingerirlos (agujas, cinta adhesiva, trozos de cuerda, ligas etc.).
- 11.- Bajo ninguna circunstancia se debe permitir que un cocodrilo escape o sea liberado con el hocico aun asegurado (Cherkiss *et al.*, 2005).
- 12.- El tiempo de manipulación no debe exceder los 20 minutos.

### **Clasificación por tamaños**

La clasificación de los animales con base en su tamaño puede ayudar para planificar el método de captura a seguir para su contención. La siguiente clasificación fue tomada de Sánchez, 2001 y se divide en: cría, juvenil, sub-adulto, adulto y adulto grande, en intervalos de 50 cm (Cuadro 1).

**Cuadro 18. Clasificación de los organismos con base en su tamaño. Tomado de Sánchez, 2001.**

<b>Etapa</b>	<b>Talla (cm)</b>
<b>Cría</b>	<b>25- 50 cm</b>
<b>Juvenil</b>	<b>51-100 cm</b>
<b>Sub- adulto</b>	<b>100-150 cm</b>
<b>Adulto</b>	<b>150-200 cm</b>
<b>Adulto Grande</b>	<b>➤ 200 cm</b>

### **CAPTURA Y CONTECION DE LOS ORGANISMOSCON BASE EN SU TAMAÑO**

#### **Crías.**

Las crías deben manejarse con mucho cuidado ya que pueden lastimarse o estresarse fácilmente. Para su manipulación se requiere solo de una persona, la cual en un solo movimiento sujetara con cuidado al animal por la nuca, enseguida se debe colocar boca abajo en la palma de la otra mano, asegurándolo con los dedos índice y pulgar cuidando de no hacer demasiada presión. Para sujetar una cría no se requiere de algún otro equipo, pues el uso de este podría llegar a lastimarla (Balderas *et al.*, 2014).

**Figura 8. Manipulación de cría de *Crocodylus acutus*.**



### **Juvenil y sub-adulto**

Para cocodrilos juveniles y sub-adultos es recomendable que el manejo sea realizado por dos personas, para este proceso se puede hacer uso de una pértiga o cuerda de alta resistencia. En primera instancia el manejador debe acercarse lo suficiente al animal para con mucho cuidado colocar la pértiga alrededor del cuello de este y en un rápido movimiento jalar de la línea con fuerza para asegurar al organismo, una vez que se dé el jalón a la cuerda el cocodrilo buscara escapar y comenzara a girar, por lo que se deberá sostener la cuerda con firmeza manteniendo una distancia adecuada, para evitar tener contacto con la mandíbula. Después, la persona que lazo al animal hará tensión con el cable mientras que otra persona sujeta la cola haciendo tensión para evitar que este siga girando, enseguida colocara una mano en la base de la cola y la otra en el cuello con suficiente fuerza para contenerlo, una vez hecho esto se colocan las rodillas al rededor del ejemplar y se sujeta el cuello con ambas manos, ya asegurado el cuello, se realizaran movimientos cortos con las manos hacia el frente para sostener la mandíbula y levantarlo en un ángulo de 45°. Cuando el animal ya está asegurado, la persona que sostenía el cable de la pértiga puede dejar de hacerlo, para tapar los ojos con cinta adhesiva y asegurar la mandíbula del animal. Por

último, de ser necesario se deben sujetar las patas traseras y delanteras con un cordón de una manera segura y cómoda para el ejemplar, asegurándose de no interrumpir el flujo sanguíneo (Balderas *et al.*, 2014).

**Figura 9. Doble tensión y monta para contención de un cocodrilo sub-adulto.**



### **Adultos y adultos grandes (reproductores)**

Para cocodrilos de mayor tamaño, es necesario hacer uso cuerdas de diversos diámetros y resistencias, además de contar con el apoyo de una o más personas (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).

El método consiste en pasar una cuerda alrededor el cuello, ya sea con ayuda de una pértiga o lazando al animal, en algunas ocasiones al intentar lazar al animal este puede reaccionar al contacto con la cuerda antes de que llegue al cuello quedando solamente sujetado por la mandíbula superior o inferior, de ser así, otra persona debe rápidamente con el apoyo de una vara larga, pasar la cuerda por en medio de la otra para sujetar el cuello. Una vez que se tiene al animal por el cuello, se asegura la mandíbula a distancia con la misma cuerda, se hace tensión y se coloca otra cuerda aproximadamente a una tercera parte de la cola, en animales muy grandes se recomienda doble tensión en la mandíbula. Posterior a

esto se hace tensión en las cuerdas y se coloca un trapo húmedo sobre los ojos y oídos del animal, con el fin de disminuir el estrés provocado por el manejo. El siguiente paso es la llamada “monta”, que consiste en posarse en la porción sacra del animal desplazándose hacia adelante a la vez que se sujetan los miembros anteriores hacia la región caudal, al tiempo que otra persona sujeta los miembros posteriores para quitarle apoyo y de este modo evitar que pueda girar. Una vez hecho esto se continua hacia adelante al cuello y hasta la mandíbula, la cual se va sujetando fuertemente con movimientos cortos desde la base hasta aproximadamente la mitad o donde sienta que estará bien asegurada, después se levanta en un ángulo de  $45^\circ$  , la persona que sujetaba la cola se monta sobre la base de la misma, quien hacia tensión con la primera cuerda se ocupara de colocar una liga de hule alrededor de la mandíbula y asegurar el trapo húmedo anteriormente colocado sobre los ojos. Ya que se tiene controlada la mandíbula se sujetan los miembros posteriores y anteriores tensándolos sobre el dorso del cuerpo de una manera segura y cómoda para el ejemplar, asegurándose de no interrumpir el flujo sanguíneo (Balderas *et al.*, 2014).

**Figura 10. Cierre de mandíbula a distancia en un ejemplar adulto de *Crocodylus acutus*.**





Figura 11. *Crocodylus acutus*, tensión por medio de 3 cuerdas para la contención del organismo.



Figura 12. Inmovilización de un cocodrilo adulto, se sujetan los miembros posteriores y se hace presión en el cuello, mientras se hace tensión con la cuerda y se levanta la cola.





Figura 13. Se sujeta la mandíbula levantándola en un ángulo de 45 °, Mientras otra persona se sienta en la base de la cola para levantarla, des esta manera se evita que el cocodrilo gire.



Figura 14. Cría liberada en el agua después de la manipulación.



#### **Liberación del cocodrilo con base en su tamaño**

Una vez que se cumplió el objetivo por el cual fue manipulado el cocodrilo, este debe ser liberado. Soltar las ataduras y liberar al animal son los aspectos en los que debe tener tanto cuidado y precaución como para contenerlos, pues suele ser un tanto más riesgoso si no se tiene el cuidado apropiado (Cherkiss *et al.*, 2005).

### **Cría.**

Las crías no representan mayor problema a la hora de ser liberadas, basta con colocarlas suavemente en el lugar de donde fueron extraídas. En caso de haber colocado cinta o liga para cerrar la mandíbula se debe asegurar de retirarla antes de liberar al animal.

### **Juvenil**

Para la liberación de un cocodrilo juvenil, este se sujeta de la mandíbula manteniendo el ángulo de 45°, la persona de apoyo retirara la cinta de los ojos y la liga de la mandíbula retirándose un poco para dejar espacio al manejador, posterior a esto, sin soltar la mandíbula se hace presión sobre la base de la cola colocando una rodilla en el suelo como apoyo, por último, se suelta el animal con un movimiento hacia adelante al tiempo que el manejador da un paso hacia atrás.

### **Sub-adulto**

Para liberar a un sub-adulto, se desamarran primero los miembros anteriores y se procede a la monta de este, teniendo cuidado de no descargar el peso sobre el animal, tratando de solo apoyar las rodillas en el suelo para tener más control sobre él. Se sujeta el cuello y se deslizan las manos hacia la mandíbula levantándola 45° aproximadamente, teniendo entonces el control del animal una persona de apoyo desamarra los miembros posteriores, por último, se retira la liga y la cinta adhesiva, se coloca solamente una rodilla el suelo como apoyo y se suelta al animal hacia el frente al tiempo que se da un paso hacia atrás.

### **Adulto y adulto grande**

En organismos de mayor tamaño se debe tener más cuidado y tomar las precauciones necesarias, en primera instancia se procede a la monta y al aseguramiento de la mandíbula con las manos, levantándola en un ángulo de 45°, una persona de apoyo montara el cocodrilo en la parte dorsal caudal levantando la cola en un ángulo de 90° y sujetándola con fuerza. Una persona más liberara los miembros anteriores y posteriores del animal y colocara una cuerda entre la piel del animal y la liga que mantiene cerrada la mandíbula, sujetándola con un fuerte nudo. Las personas que se encuentran sobre el animal presionaran con sus piernas las patas para evitar que este se mueva antes de liberarlo por completo,



ambas personas dejaran al animal una de cada lado, retirándose rápidamente hacia la parte contraria de donde se encuentra la mandíbula y por último se hala con fuerza la cuerda que sostiene la liga para zafarla y dejar libre la mandíbula del cocodrilo (Figura 13).

**Figura 15. Liberación de un cocodrilo adulto, se hala con fuerza de la cuerda que está amarrada a la liga que mantiene la mandíbula cerrada.**



### **Contención química**

La contención química en reptiles se hace compleja debido a su metabolismo lento y a la dependencia existente entre el animal y la temperatura ambiental (Rojas, 2002). Es poco recomendable en los cocodrilos, debido a que estos presentan un sistema circulatorio y excretor relativamente simple, en consecuencia, responden lentamente a la mayoría de las drogas y la recuperación resulta muy lenta, tomando incluso varios días para que el organismo pueda recuperarse por completo, por lo tanto, debe ser utilizada solo en ocasiones excepcionales (Jacobson, 1984).

Anestésicos probados en cocodrilos (Bennett, 1991, Jacobson, 1984, Rojas, 2002, [http://www.laboratoriouniversal.com/biblioteca/zoetil\\_tabla\\_dosis.pdf](http://www.laboratoriouniversal.com/biblioteca/zoetil_tabla_dosis.pdf)).

## **1.- Ketamina**

40-60 mg/kg Intra muscular (IM).

- Administrar en los músculos de los miembros anteriores.
- Inducción en 15-30 minutos.
- Requiere una anestesia adicional para cirugía.

### **1.1.- Ketamina + Xylazine**

- Administrar Xylazine 30 minutos antes que la Ketamina.
- Utilizar como antídoto Atipamezol.

## **2.- Pentobarbital**

7.5-15 mg/kg IP

- Recuperación hasta 5 días, efectos imprevisibles.
- No está recomendado durante el período de recuperación.
- Por vía intramuscular produce anestesia en el animal por un aproximado de una hora, pero la recuperación a menudo requiere de hasta 72 horas.

## **3.-Halotane/ Isoflurane**

- Usar después de una premeditación con ketamina; de otro modo, resulta con apnea en inducción prolongada en especies que se zambullen.
- utilizar la máscara nasal, oxigenación previa por 3 minutos con oxígeno al 100%, luego dar Halotane al 4% o isoflurane hasta que la mandíbula sea relajada.
- Bloquear la boca abierta, entubar y mantener con presión de ventilación positiva, utilizar oxígeno al 100%, luego dar un gas anestésico al 0.5-2%.
- No exceder 10 cm de presión de agua durante PVP; ventilar 4-6 veces por minuto a 10-20 ml/kg de volumen de aire.

## **4.-Avertin**

.50g/kg

- Administrado por vía rectal
- produce efecto dentro de los primeros 5 minutos
- El cocodrilo se vuelve lento y poco dispuesto a luchar, a los 20 minutos la droga hace efecto.
- La recuperación requiere de 19 horas.
- En cantidades mayores resulta letal para el organismo.

## **5.- Tiletamina/zolazepam**

5.0 -10.0 mg/kg IM + 1 mg/kg acepromacina IM

- Se debe tomar en cuenta el metabolismo lento de los reptiles, así como el metabolismo más lento de los anestésicos en caso de una temperatura corporal baja.

### **Toma de datos**

Como se mencionó anteriormente uno de los propósitos para la contención de un cocodrilo es la toma de datos morfométricos, esta nos permitirá determinar la estructura de la población y llevar un registro del crecimiento y morfología los organismos. En el caso de las medidas craneales, estas se registran con ayuda de un Vernier siempre que las condiciones lo permitan, para las medidas restantes y organismos de mayor tamaño se utiliza una cinta métrica flexible. Las mediciones deben ser realizadas por una misma persona para disminuir el porcentaje de error.

### **Datos morfométricos (Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).**

1.-Todas las medidas deben ser tomadas en cm.

#### **Material**

1.- Cinta métrica flexible de 5 y 10m (figura 14).

2.- Vernier.

3.- Bascula.

5.- Hoja de datos (Cuadro 2).

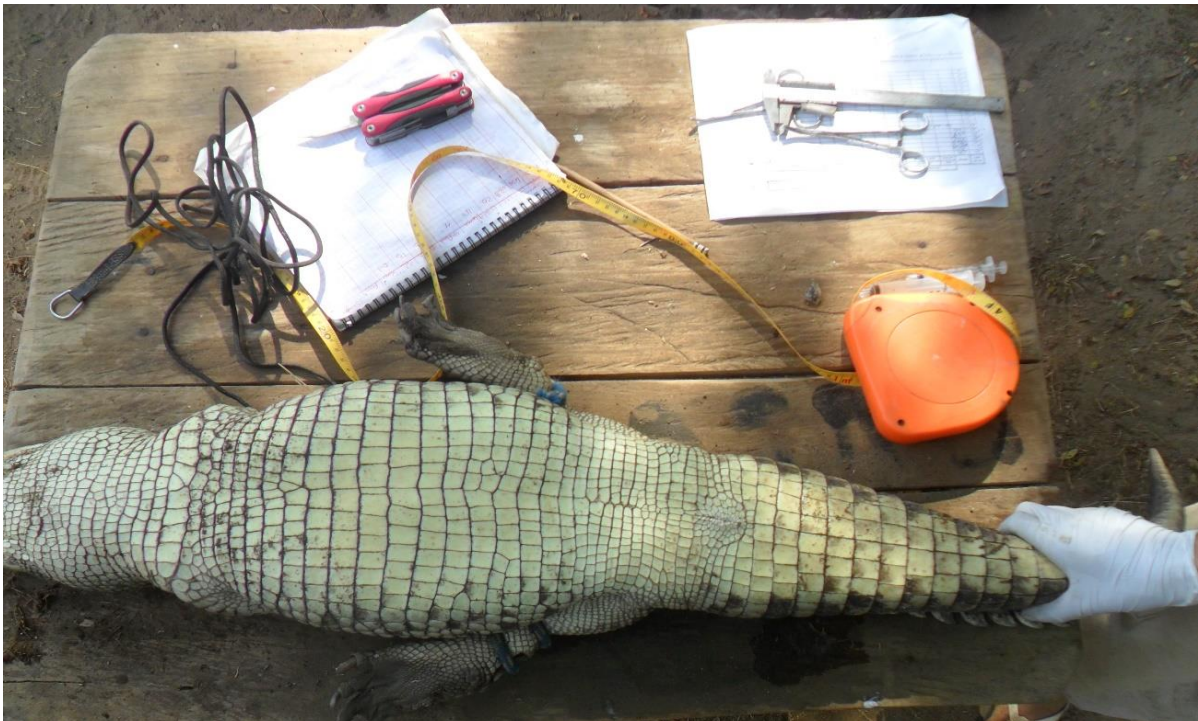
6.- Tabla de campo.

6.- Lápiz.

**Figura 16. Pesa romana y cintas métricas flexibles de 1 y 10 m.**



**Figura 17. Cocodrilo en posición decúbito dorsal para la toma de datos morfométricos.**





## **Medidas básicas necesarias**

### **1. Longitud total (LT).**

Se mide desde la punta del hocico hasta la punta de la cola.

### **2. Longitud hocico cloaca (LHC).**

Se mide desde la punta del hocico hasta donde inicia la cloaca.

-Estas medidas nos dan un dato exacto de las dimensiones generales del cuerpo.

-Estas medidas se toman por la parte ventral del organismo (Imagen 11).

## **Figura 18. Toma de datos morfométricos, longitud hocico cloaca por la parte ventral.**



### **1. Longitud total del cráneo (LTC).**

Se mide desde la punta del hocico hasta el borde posterior del hueso supraoccipital.

### **2. Ancho del Cráneo 1 (AC 1).**

Se mide la parte más ancha del cráneo, entre los extremos de los huesos cuadrados.

### **3. Ancho del cráneo 2 (AC 2).**

Se mide la anchura entre las protuberancias maxilares.

#### **4. Ancho del cráneo 3 (AC 3).**

Se mide la anchura entre las protuberancias premaxilares.

Estas mediciones nos indican el tamaño de la estructura craneal, importante en la identificación de las especies.

Estas medidas se obtienen con el animal boca abajo.

#### **5. Perímetro de la base de la cola (AC).**

Se mide a la altura de la tercera línea transversal de escamas caudales, posterior a la pelvis (Figura 17). Esta medida tiene relación con la condición corporal del animal.

**Figura 19. Medida del perímetro de la base a la altura de la tercera línea de escamas a partir de los miembros posteriores utilizando un vernier.**





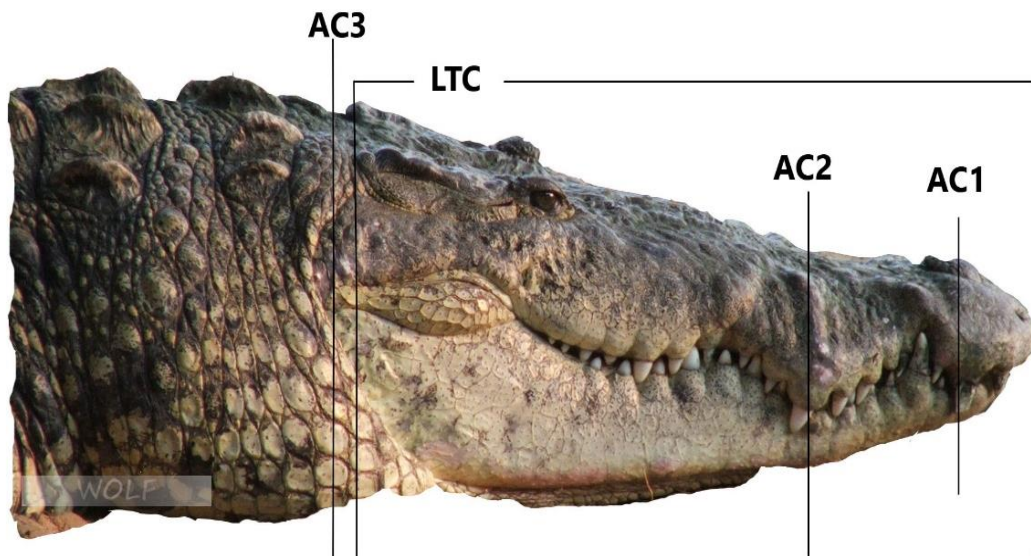


Figura 20. Muestra el punto de referencia exacto para las medidas craneales básicas a obtener.

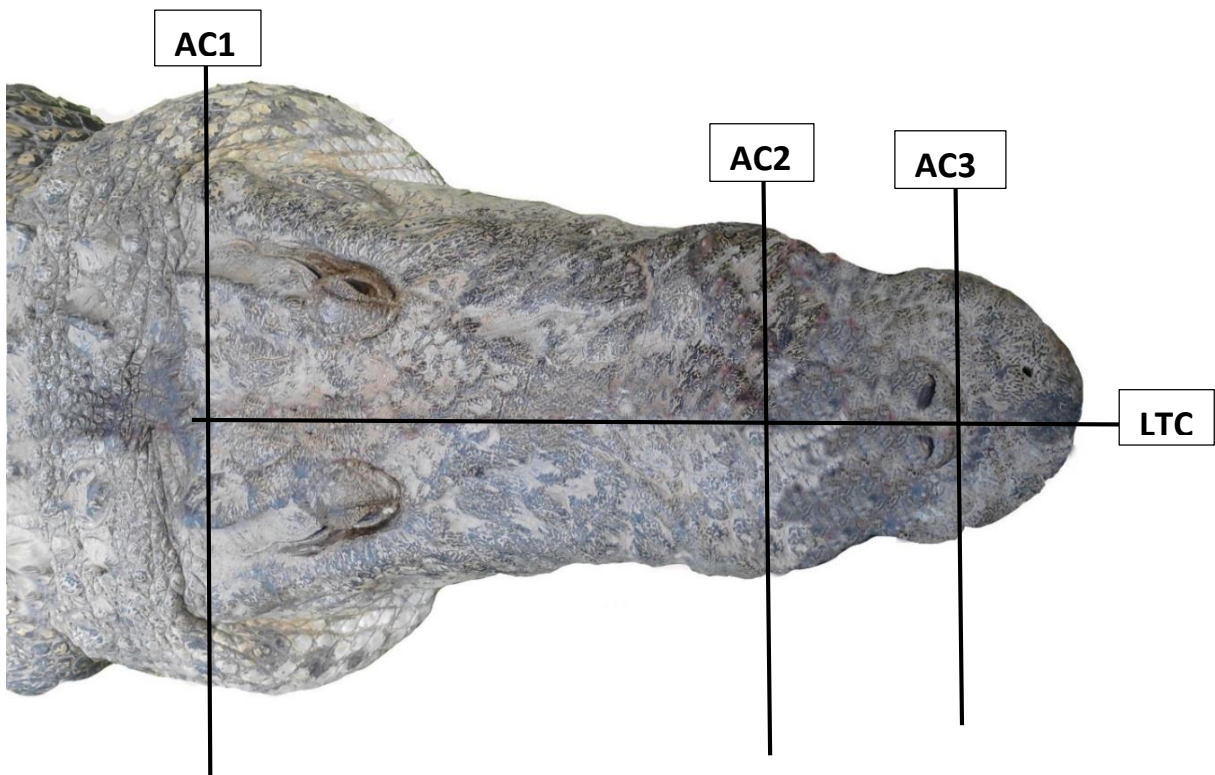


Figura 21. Vista dorsal del cráneo, marcando los puntos exactos para la obtención de medidas craneales.

## **Peso**

Determinar el peso de un organismo dependerá del tamaño de este, una cría bastara con un cordón atado a forma de pechera o una liga, para organismos juveniles se pueden utilizar sacos o redes, tomando en cuenta el peso de estos últimos y para organismos adultos es recomendable utilizar un amarre circular y hacer uso de la misma cuerda para colocarlo en la báscula.

Para determinar el peso de los organismos, se debe contar con básculas o pesolas con diferentes capacidades (2kg, 10 k, 100kg etc.), la necesidad de las mismas dependerá de la variedad en tamaño de los organismos.

-Estas medidas dan una idea de la condición corporal del animal.

**Figura 22. Pesaje de un cocodrilo adulto.**



## **Sexado**

Los cocodrilos son organismos que aparentemente no presentan un dimorfismo sexual hasta que son adultos, cuando llegan a esta etapa ordinariamente suelen distinguirse porque el macho suele ser más grande y alargado, las masas musculares de la mandíbula muy abultadas, y la joroba prefrontal es más



exagerada, la hembra por su parte es un tanto gruesa, la cola más corta y el hocico menos alargado. Sin embargo, aun con estas diferencias suele ser difícil tener la certeza del sexo del organismo a simple vista (Álvarez del Toro y Singler, 2001).

Para determinar el sexo de un cocodrilo, los métodos más utilizados son: la evaginación del pene y el tacto cloacal. En ambos métodos es indispensable el uso de guantes para protección tanto del animal como del manejador, debido al contacto directo que se tiene con la cavidad cloacal.

### **Evaginación del pene**

Para determinar el sexo del organismo por este método, se debe colocar al cocodrilo en posición natural sobre una superficie plana, a continuación, se flexiona la cola hacia arriba, ejerciendo presión en la parte inferior de la cloaca con el dedo pulgar y el dedo índice, el pene sobresaldrá si se trata de un macho (Figura 19), (Chabreck, 1963, INE, 2000, Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).

**Figura 23. Evaginación del pene de un cocodrilo.**



### **Tacto cloacal.**

El sexo de los organismos de mayor tamaño, se puede determinar por medio del tacto cloacal, este consiste en insertar el dedo índice en la cloaca moviéndolo suavemente a través de la cavidad y a lo largo del piso ventral con dirección hacia los miembros anteriores (Figura 20). Si el animal es macho, se sentirá una protuberancia dentro de la cavidad (Chabreck, 1963, INE, 2000, Álvarez del Toro y Singler, 2001, Sánchez-Herrera *et al.*, 2011).

**Figura 24. Tacto cloacal para determinar el sexo de un organismo.**

### **Registro fotográfico**



Para llevar a cabo una adecuada identificación de los organismos que se tiene en cautiverio, es recomendable contar con un registro fotográfico de los mismos, de esta manera no habrá errores en la ubicación de un ejemplar determinado.

El registro fotográfico deberá obtenerse con una cámara destinada exclusivamente para este proceso, utilizando las mismas especificaciones para cada una de las fotografías obtenidas. Se debe contar con un expediente para cada uno de los



organismos que requieran un registro detallado, este deberá contener los datos morfométricos y fotografías del mismo.

Las fotografías mínimas necesarias para el archivo son:

- 1.- Fotografía del organismo completo.
- 2.- Escamación ventral (Figura 21).
- 3.- Escamación ventral caudal.
- 4.- Patrón de escutelación nugal.
- 5.- Escutelación dorsal (Figura 22).
- 6.- Marcas o alteraciones.
- 7.- Marcaje.

**Figura 25. Registro fotográfico de escamación ventral caudal, se puede apreciar el patrón claramente un patrón particular en el organismo.**



**Figura 26. Registro fotográfico del Patrón de escutelación dorsal.**



### **Toma de muestras**

La obtención de las muestras es el primer y más importante paso en cualquier estudio de diversidad. Por lo tanto, es de suma importancia contar con la información necesaria para llevar a cabo la correcta toma y conservación de las muestras, además de contar con una previa planeación de lo que se va a hacer (FAO, 2010).

Para obtener y manipular muestras biológicas de reptiles en cautiverio, se debe tomar en cuenta que estos suelen ser más vulnerables a colonizaciones por microorganismos zoonóticos que aquellos que se encuentran en vida libre. Otro factor que se debe tomar en cuenta es que se trata de organismos poiquiloterms y por lo tanto, la flora microbiana que poseen es muy diferente a la que se pudiese encontrar en organismos homeoterms, de tal modo que microorganismos como *Salmonella* spp son normales dentro de la flora y tracto gastrointestinal en muchas



especies de reptiles. La naturaleza zoonótica de la salmonelosis en los animales en cautiverio puede resultar del intercambio entre los cuidadores y ellos, ya sea por contacto directo o manipulación. Los agentes infecciosos involucrados en zoonosis pueden ser transmitidos a través de distintos mecanismos: contacto directo, ingestión, inhalación, por vectores intermediarios, arañazos o mordeduras. No solo bacterias zoonóticas representan un riesgo, si no también algunos otros microorganismos como virus y parásitos (Carriquiriborde, 2010). Un ejemplo de ello es el Virus del Nilo Occidental (VNO), del cual se ha reportado que los cocodrilos pueden servir como reservorios y hospederos amplificadores, siendo así una fuente de infección para los humanos a través del contacto con heces y tejidos de animales infectados (Nevarez *et al.*, 2005). Debido a estos potenciales riesgos, es necesario que todas aquellas personas involucradas en el manejo de este tipo de organismos, adopten buenas prácticas de higiene y bioseguridad, protegiendo las membranas mucosas y la piel de cualquier material que pueda resultar infeccioso. Por lo tanto, el uso de guantes para la manipulación de los organismos es indispensable, principalmente cuando se tiene contacto con las mucosas o cuando se pretende obtener y manipular muestras biológicas como sangre y/o tejidos (Carriquiriborde, 2010).

### **Extracción de muestra sanguínea**

Cuando se pretende obtener y manipular muestras de biológicas es indispensable el uso de guantes, pues el contacto directo con este material puede representar un riesgo para el manejador debido a las enfermedades zoonóticas que pudiesen albergar alguno de los organismos a manipular.

Las muestras de sangre en cocodrilianos se utilizan principalmente para efectos de salud en general y/o proyectos de investigación en laboratorio relacionados con la conservación de la especie, estas investigaciones a menudo dependen de la capacidad de quien obtiene la muestra. La cantidad a extraer dependerá del tamaño del organismo y el tipo de análisis que se requiera.

Los puntos de acceso anatómico más utilizados para extraer sangre en cocodrilídos son:

**1.-El Seno post occipital.**

**2.-Directamente del corazón.**

**3.-La vena caudal ventral.**

### **Material**

1. Jeringas calibre 21 y/o 22 dependiendo del tamaño de los organismos.
2. Tubos Vacutainer® con Heparina de litio (tubo con tapa verde) o EDTA (tubo con tapa morada).
3. Guantes de látex.
4. Torundas humedecidas con alcohol de uso médico.
5. Recipiente contenedor de desechos punzocortantes.
6. Bolsa plástica para residuos contaminados con sangre.
7. Hielera para el transporte de las muestras.
8. Hielo.
9. Marcador permanente.

### **Extracción de una muestra de sangre de la vena post-occipital.**

El seno post occipital de la vena espinal a la altura de la nuca, también llamada vena yugular interna, se utiliza comúnmente para la obtención de muestras de sangre de cocodrilos. La muestra se obtiene por punción de la vena post-occipital situada dorsal a la medula espinal, en el espacio intervertebral, inmediatamente caudal al occipital, mediante la inserción de una aguja hipodérmica. El procedimiento a seguir es el siguiente:

Primeramente, se lleva a cabo la contención del cocodrilo, este se coloca en posición natural, es decir sobre su superficie ventral, se utiliza una jeringa calibre 21 o 22, esto dependerá del tamaño y condición corporal del animal. La vena se encontrara por la línea media craneal, a la altura del límite craneal de los dos primeros osteodermos cervicales dorsales, se debe limpiar el área con una torunda humedecida con alcohol, una vez hecho esto, se accede mediante la inserción de la aguja en forma perpendicular, esta se pasa lentamente hacia la columna vertebral, con cuidado de no pasar a la médula espinal, cuando se

percibe una sensación arenosa, indica que la punta de la aguja está cerca o en el vaso sanguíneo, la sangre se obtiene mediante la creación de un vacío constante con la jeringa, bastara con extraer 2ml de sangre. Es de vital importancia evitar cualquier movimiento de la aguja, pues esto podría causar daño al animal. Para mantener la punta de la aguja en el vaso sanguíneo se puede ayudar sujetándola entre el dedo pulgar y el índice, apoyándose en el cuello del cocodrilo, al tiempo que con la otra mano se vacío. En el caso de cocodrilos de gran tamaño, el colector puede sentarse en la cavidad torácica del animal para tener un mayor control. La profundidad del seno venoso variará según el tamaño y condición corporal del cocodrilo, en organismos de 1.5 m a 2.0 m de largo la profundidad aproximada será de entre 2.5 a 3.5 cm y en ejemplares mayores a 3m hasta 7cm de profundidad. En cocodrilos más grandes, el vaso sanguíneo será comparativamente más profundo y por consecuencia un tanto más difícil de encontrar, debido a que la punta de la guja se vuelve menos eficaz cuanto mayor es la profundidad.

Se debe proceder con mucho cuidado durante la aspiración de la sangre, para no extraer por accidente líquido cefalorraquídeo, causando daños innecesarios al animal, si se percibe un color muy tenue en la muestra es indicio que se está extrayendo líquido cefalorraquídeo. Por otra parte, si se perfora demasiado con la punta de la aguja, puede haber contacto con la medula espinal, lo que resulta en un inmediato movimiento muscular involuntario, existiendo la posibilidad de lesionar la médula espinal del animal (Jacobson, 1984, Troiano, 2013, Myburgh *et al.*, 2014).

### **Extracción de una muestra de sangre por punción cardiaca.**

La punción cardiaca, es otro método que puede ser utilizado para la obtención de las muestras de sangre. En este procedimiento el animal debe colocarse en decúbito dorsal, es decir recostado boca arriba. El corazón del cocodrilo se encuentra en la línea media, en el nivel de la fila 11 y 12 de los escudos contando hacia atrás desde la banda ancha por encima de las extremidades anteriores. Se introduce la aguja montada en la jeringa, aproximadamente 7cm por detrás del

esternón, hacia adelante y abajo en un ángulo aproximado de 45° hasta alcanzar el corazón.

La técnica de punción cardíaca no suele ser muy recomendada, pues los riesgos que se corren suelen ser altos, debido a las lesiones que podrían ocasionarse en las estructuras del corazón, causando graves daños al animal e incluso la muerte (Jacobson, 1984, Troiano, 2013).

Extracción de sangre de la vena caudal ventral.

Una muestra de sangre también se puede obtener a partir de la vena caudal localizada a lo largo de la cola, esta se encuentra ventral a las vértebras de la cola. Para la extracción de la muestra, el animal se colocara en posición decúbito ventral (boca abajo) y se levanta la cola a aproximadamente 90° manteniéndola derecha, se divide la misma en tres porciones imaginarias a partir de la cloaca y aproximadamente a un tercio de distancia en la línea media se introduce lentamente la aguja en ángulo recto hasta llegar al hueso, se retira suavemente la aguja creando vacío en la misma para obtener la muestra (Figura 26), por último se hace presión con una torunda sobre la zona donde se obtuvo la muestra y se rocía un poco de Aluspray . (Jacobson, 1984, Troiano, 2013).

Si bien existen diversas maneras de obtener las muestras sanguíneas en crocódilidos, la técnica más recomendable, tanto para organismos juveniles como adultos es la punción de la vena caudal ventral, pues esta técnica permite obtener una buena muestra sanguínea en cuanto a volumen, rapidez de ejecución y presenta un mínimo riesgo para el animal a comparación de las otras dos técnicas anteriormente mencionadas. Además, los riesgos para quien toma la muestra también son menores al utilizar esta técnica (Troiano, 2013).



**Figura 27. Extracción de sangre de la vena caudal ventral de un cocodrilo adulto.**



### **Conservación y traslado de la muestra sanguínea.**

Una vez que se ha obtenido la muestra la muestra de sangre esta se deposita en tubos al vacío Vacutainer®, ya sea con Heparina de litio (tubo de color verde) o EDTA (tubo de color morado), para prevenir que la muestra se coagule. La utilización de la heparina de litio o la heparina de sodio no interfieren en los resultados de análisis de bioquímica en cocodrilos, por lo que se podría usar indistintamente uno u otro tipo de anticoagulante (Padilla *et al.*, 2009).

Para depositar la sangre en los tubos se introduce la aguja a través de la tapa de este colocándolo en un ángulo de 45°, girando suavemente mientras la sangre se desliza por las paredes del mismo. Una vez que la sangre se encuentra en el tubo, debe ser identificada con los datos mostrados a continuación.

**Figura 28. Tubos Vacutainer® EDTA y Heparina de litio.**



### **Etiquetado de la muestra**

El tubo deberá ser etiquetado con los siguientes datos, usando un marcador permanente.

- 1.-Número de muestra.
- 2.-Número de organismo.
- 3.-Especie.
- 4.-Lugar de procedencia.
- 5.-Fecha.

Una vez que la muestra alcanza la temperatura ambiente esta se debe mantener en refrigeración a 4°C, posteriormente se depositara en una hielera para su traslado al laboratorio.

### **Obtención de muestra de tejido.**

La muestra de tejido por lo general se obtiene cortando las quillas o escamas caudales, para obtener la muestra se identifica si el animal presenta algún tipo de marcaje, de ser así se remarca cortando la base de las escamas ya amputadas, de no ser así se realiza el marcaje siguiendo el patrón de identificación establecido (Sánchez, 2001).

## Material.

- 1.- Guantes.
- 2.- Navaja para bisturí del número 22 (una por cada organismo).
- 3.- Tubos Falcón de 15 ml (Figura 28).
- 4.- Torundas humedecidas con alcohol etílico.
- 5.- Aluminio micronizado (Aluspray).
- 6.- Alcohol etílico.
- 7.- Marcador.

**Figura 29. Tubos Falcon de 15 ml. Utilizados para depositar la muestra de tejido.**

### Corte de quillas



Es importante no confundir cicatrices naturales con marcajes previos, pues es común que los cocodrilos presenten diversas cicatrices o lesiones provocadas por su propia conducta natural, las cuales confundirse con facilidad. Sin embargo, si un ejemplar se marca desde etapas tempranas y los cortes se hacen casi hasta la base de la cresta y de forma recta, no debería confundirse (Sánchez-Herrera, 2011). Para el corte de escamas, se utilizan las crestas situadas en la parte dorsal y posterior de la cola, las cuales son denominadas quillas. El sistema de corte es limitado a un lapso de entre 5 y 10 años, puesto que el crecimiento y desgaste natural de las placas hace que puedan perderse las señales (Martínez, 2008, Sánchez, 2001).



El corte de la quilla o escama , se realiza con una navaja para bisturí , primero se debe limpiar el área con una torunda humedecida con alcohol etílico, posteriormente se sujeta la escama con los dedos índice y pulgar para realizar la amputación, se corta el tejido desde la base de la escama, esto se debe hacer de manera rápida evitando la contaminación de la muestra , una vez hecho el corte se ejerce presión sobre la herida con una torunda humedecida con alcohol y finalmente se aplica Aluminio micronizado (Aluspray) sobre la herida para ayudar a la cicatrización.

**Figura 30. Corte de quilla para obtención de muestra de tejido.**

**Conservación de la muestra de tejido.**



El tejido obtenido del corte de la escama o escamas, se depositará en un tubo falcón de 15ml agregando alcohol etílico al 90% hasta cubrir por completo el material biológico, esto con el fin de evitar la descomposición del mismo. Por último, se lleva a cabo la identificación de la muestra.

**Etiquetado de la muestra.**

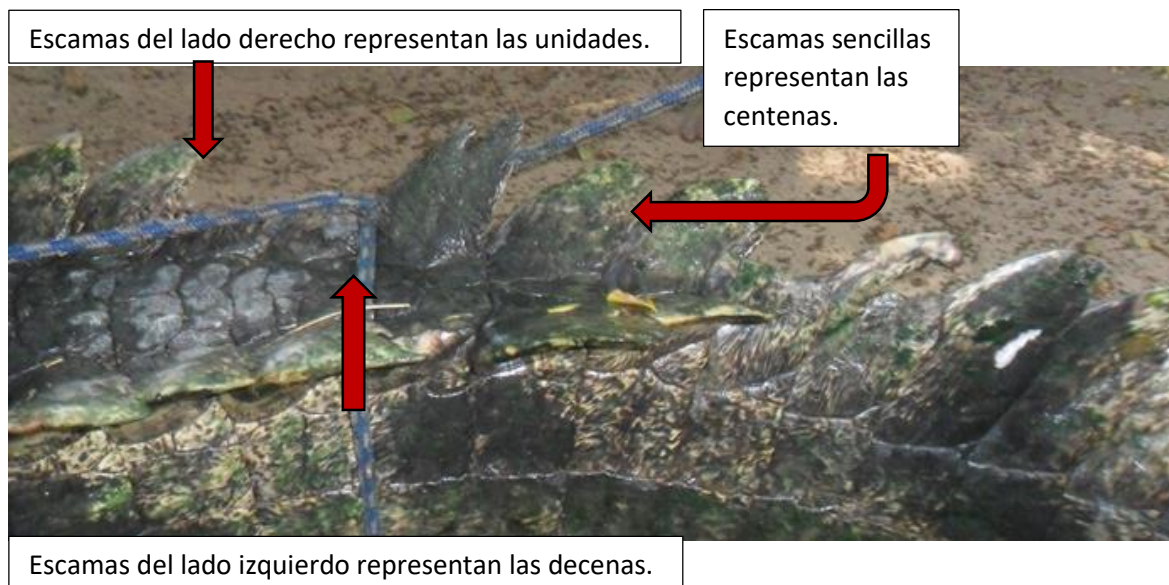
- 1.- Numero de muestra.
- 2.- Número de organismo.

- 3.- Lugar de procedencia.
- 4.- Especie.
- 5.- Fecha de colecta.

### **Marcaje.**

Existen diversos métodos para el marcaje de los organismos siendo algunos más invasivos que otros, un sistema de identificación ideal es aquel que puede ser rápido, de fácil aplicación, de fácil reconocimiento y que tenga una permanencia de varios años en los ejemplares marcados. El método de marcaje más utilizado generalmente es el la numeración y corte de quillas, la identificación puede variar dependiendo de la UMA o investigador que lo realiza. Sin embargo, el patrón generalmente es utilizado es el siguiente:

**Figura 31. Patrón de marcaje por medio de la amputación de las escamas caudales.**



### **Traslado de las muestras al laboratorio**

Una vez que se han obtenido las muestras, estas deben ser trasladadas al laboratorio para ser procesadas, si se trata de muestras de tejido solo se debe asegurar que los contenedores estén bien cerrados, se puede utilizar cinta adhesiva o papel film para asegurarse que no haya fugas y que el nivel de alcohol no disminuya por debajo del material biológico.

Las muestras de sangre deben mantenerse en refrigeración hasta el momento de su traslado al laboratorio, una pequeña hielera puede ser útil para mantener baja la temperatura de las muestras mientras son llevadas al laboratorio. Dependiendo de la distancia o el tiempo de traslado se debe vaciar el agua y renovar el hielo las veces que sea necesario.

### **Manejo de residuos.**

#### **Manejo de residuos basado en lo descrito por (Reyes, 2009).**

Los residuos biológicos deben ser manejados adecuadamente para evitar daños ambientales y posibles alteraciones en la salud de la población. Por lo tanto, es necesario determinar criterios y procedimientos para la manipulación de los mismos. La Norma Oficial Mexicana establece las características para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos, biológicos, infecciosos NOM-087-ECOL 1995 D.O.F. 17-11-2002. La NOM-052-SEMARNAT-2005 establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

#### **Clasificación de residuos (NOM-052-SEMARNAT-2005).**

- 1.- Una muestra biológica se considera una parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis.
- 2.- Los residuos que se denominan peligrosos biológicos infecciosos: son aquellos materiales generados en los laboratorios que contengan agentes peligrosos biológico-infecciosos y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente (sangre, tejidos, humores o animales muertos).
- 3.- Los objetos punzocortantes que se consideran residuos biológico-infecciosos, son los tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, bisturís y estiletes de catéter que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el trabajo experimental.

Cuando se extrae o manipula una muestra de algún organismo vivo, se debe tomar en cuenta que el material utilizado no puede desecharse como basura común, ya que este ha estado en contacto con material biológico de los organismos manejados.

### **Sangre**

La sangre, las biopsias, las partes amputadas, los tejidos y órganos son considerados como residuos biológico- infecciosos por lo tanto sus residuos deben tener un tratamiento especial.

### **Desechables**

Los recipientes desechables, materiales de curación y otros materiales desechables como; Compresas, Gasas, Hisopos, Bolsas etc. que contengan sangre son considerados como residuos biológico-infecciosos no anatómicos, que requieren al igual que los anteriores un tratamiento especial para su desecho.

### **Objetos punzocortantes**

Los objetos punzocortantes que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas como; tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringa desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto se deben almacenar aparte para su proceso de desecho.

### **Recomendaciones de envasado**

El envasado de los residuos generaos peligrosos biológico infecciosos no deberá mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

1. Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda residuos peligrosos biológico infecciosos y deberán cumplir los valores mínimos de los parámetros indicados en la Norma Oficial Mexicana vigente correspondiente.

2. Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de

una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique “Residuos Peligrosos punzocortantes biológico infecciosos” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

**3.** Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, deberán contar con la leyenda que indique “Residuos peligrosos líquidos biológico infecciosos” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

**4.** Las bolsas y los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes, sólidos y líquidos se llenarán hasta el 80% (ochenta por ciento) de su capacidad, asegurándose los dispositivos de cierre y no deberán ser abiertos o vaciados (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).



## **Análisis Genéticos.**

Una vez que las muestras han llegado al laboratorio estas deberán mantenerse en refrigeración a aproximadamente 4°C hasta el momento de su uso.

### **Extracción de ADN**

El primer paso realizar un análisis de variación genética, es obtener el material genético con el que se pretende trabajar. Por lo que extraer ADN de las muestras obtenidas, será el primer objetivo en el procesamiento de las muestras. Los protocolos de extracción de ADN difieren entre sí de acuerdo al tipo de muestra que se ha obtenido. En cocodrilos las muestras suelen de tejido o sangre, sin embargo, esta última puede llegar a coagular por lo que se incluye un protocolo para estos casos

### **Protocolo de extracción de ADN de sangre**

1. Homogeneizar la muestra por al menos 20 minutos y transferir 30 µL a un microtubo de 2 ml.
2. Centrifugar la muestra por 5 min a 1,500 rpm.
3. Transferir el sobrenadante (plasma, queda una capa blanca delgada) a un tubo nuevo de 1.5 mL, etiquetarlo y congelarlo a -20°C.
4. Agregar 1 mL de SRL (10mM TRIS-HCl pH 8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl).
5. Centrifugar 10 min a 3,000 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente evitando perder el pellet en el fondo del tubo, (contiene leucocitos, capa blanca).
- 8.- El sobrenadante deberá ser desechado en un frasco de vidrio con Cloro común.
7. Añadir 1 mL de buffer SRL y disolver el pellet de glóbulos blancos (GB) suavemente, hasta que se disuelvan todos los aglomerados que pudieran volver a encerrar los glóbulos rojos.
8. Centrifugar 5 min a 3,000 rpm.
9. Eliminar el sobrenadante (el pellet debe estar bien compacto).
10. Volver a añadir 1ml de buffer SRL y resuspender el precipitado

11. Repetir el paso 7 hasta que se observe un pellet de color blanco y un sobrenadante claro rojizo (debe quedar de un color muy claro, por lo que debe repetirse las veces que sea necesario).
12. Una vez eliminado el sobrenadante de la última centrifugación, añadir 0.9 ml de TE (10mM TRIS-HCl pH 8.0, 1mM EDTA).
13. Añadir 10  $\mu$ L de proteínas K (20 mg/mL).
14. Añadir 60  $\mu$ L de EDTA 0.5 M más 90  $\mu$ L de SDS 10% y agitar suavemente.
15. Incubar con agitación suave 2 horas a 50 o 37°C.
16. Añadir 400  $\mu$ L de NaCl 5 M y agitar fuertemente.
17. Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm.
18. Recoger el sobrenadante (debe estar traslucido rojizo) y transferirlo a nuevos tubos de 1.5 mL (aproximadamente 400  $\mu$ L de muestra por tubo).
19. Añadir a cada tubo 5  $\mu$ L de PAGE (acrilamida).
20. Añadir a cada tubo 1 mL de etanol absoluto y mezclar por inversión. Debe aparecer un precipitado en forma de “medusa”.
21. Incubar a -20°C durante al menos 20 min o toda la noche.
22. Centrifugar por 20 min a 4°C, a 13,000 rpm.
23. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
24. Agregar 10  $\mu$ L de TE.
25. Incubar 10 min a 37°C.
26. Congelar la muestra hasta su uso.

### **Dilución de las muestras**

En algunos casos las muestras suelen presentar una consistencia muy viscosa, si este es el caso se debe utilizar el siguiente método para diluir las muestras y disminuir dicha consistencia:

1. Dividir la muestra en 2 tubos de 2ml, con aproximadamente 1 ml de muestra en cada uno.
2. Poner a baño María durante 15 min a 56°C.
3. Añadir a la muestra 200  $\mu$ L de TE y 100  $\mu$ L de CTAB y agitar en el Vortex hasta deshacer las capsulas formadas.
4. Poner en baño Maria por 10 min a 56°C.

5. Anadir 750  $\mu$ L de Fenol-Cloroformo-Isoamilico.
6. Agitar en Vortex por 30 segundos hasta que la capsula se haya disuelto.
7. Centrifugar 5min a 10,000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante a tubos de 1.5 ml (se debe tener cuidado de no levantar las partículas del fondo).
9. Añadir 400  $\mu$ L de NaCl 5 M y agitar fuertemente.
10. Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm.
11. Recoger el sobrenadante (debe estar traslucido rojizo) y transferirlo a nuevos tubos de 1.5 mL (aproximadamente 400  $\mu$ L de muestra por tubo).
12. Añadir a cada tubo 5  $\mu$ L de PAGE (acrilamida).
13. Añadir a cada tubo 1 ml de etanol absoluto y mezclar por inversión. Debe aparecer un precipitado en forma de "medusa".
14. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 20 min o toda la noche.
15. Centrifugar por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , a 13,000 rpm.
16. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
24. Agregar 10  $\mu$ L de TE.
25. Incubar 10 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .
26. Congelar la muestra hasta su uso.

### **Protocolo para la extracción de ADN de tejido**

- 1.-Cortar aproximadamente 100 mg de tejido en fragmentos pequeños con ayuda de una navaja de un solo filo y colocar en un tubo de 1.5 mL (entre más pequeños sean los fragmentos, más fácil será degradar el tejido).
2. Agregar 600  $\mu$ L de buffer de extracción (10mM TRIS-HCl pH 8.0, 400mM NaCl, 20mM EDTA, 0.5% SDS).
3. Agregar 5  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/mL) e incubar a  $56^{\circ}\text{C}$  por una hora.
4. Revisar al término de este tiempo si el tejido se encuentra totalmente digerido, de lo contrario adicionar nuevamente 5  $\mu$ L de Proteinasa K e incubar durante otra hora.
5. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo y congelar el tejido no digerido.

7. Adiciona al sobrenadante 500  $\mu$ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1) y agitar vigorosamente con ayuda de vortex.
8. Centrifugar la muestra a 10000 rpm durante 2 min.
9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
10. Adicionar 500  $\mu$ L de cloroformo y agitar vigorosamente con ayuda de vortex.
11. Centrifugar la muestra a 10000 rpm durante 2 min.
12. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 50  $\mu$ L de Acetato de sodio 3M pH 6.0, homogeneizar por inversión 7 veces.
13. Adicionar 7  $\mu$ L de acrilamida lineal para ADN, homogeneizar por inversión 7 veces.
14. Adicionar 1 mL de etanol al 100% frio.
15. Incubar 5 min en hielo.
16. Centrifugar a 13,000 rpm a 4 °C, durante 15 min.
17. Decantar el sobrenadante y conservar la pastilla.
18. Adicionar 1 mL de etanol al 70% frio sin suspender la pastilla.
19. Incubar 5 min en hielo.
20. Centrifugar a 13,000 rpm a 4 °C, durante 15 min
21. Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla durante 10 min a 37°C con la tapa abierta.
22. Suspender la pastilla en 40  $\mu$ L de TE (10mM TRIS-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).
23. Congelar la muestra hasta su uso.

### **Protocolo para la extracción y purificación de ADN de un coagulo de sangre**

En algunas ocasiones las muestras de sangre ya tienen algún tiempo que fueron extraídas o simplemente no se mezclaron bien con el anticoagulante usado en el tubo, por lo que llegan a formar un coagulo, en dado caso el protocolo a seguir es el siguiente:

1. Pesar un tubo de 15 ml de fondo cónico.
2. Obtener coagulo de la muestra, colocando en un tubo de centrifuga y volver a pesar.
3. Tomar una parte del coagulo (200 mg) y depositarlo en un tubo nuevo.

4. Por cada 200 mg de muestra agregar 1 mL de solución de lisis (10mM TRIS-HCl pH 8.0, 400mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS).
5. Por cada mL de solución de lisis agregar 100 µg de Proteinasa K (5 µL a una concentración de 20mg/mL).
6. Incubar durante dos horas a 37 °C con agitación constante, el coagulo debe de desaparecer en este lapso de tiempo, sino ocurre agregue más Proteinasa k (2 µL por mL de muestra).
7. Recupere el sobrenadante en alícuotas de 500 µL en microtubos de 1.5 mL y adicionar 50 µL de NaCl 5M.
8. Agregar 500 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (24:25:1) y homogeneizar con ayuda de vortex.
9. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.
10. Colocar sobrenadante en nuevos tubos.
11. Agregar nuevamente 500 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico y homogeneizar con ayuda del vortex.
12. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.
13. Repetir el paso 8 hasta que el sobrenadante que se obtenga se vea traslucido (tendrá un color rojo cristalino).
14. Agregar 50 µL de acetato de sodio.
15. Agregar 1 mL de etanol absoluto.
16. Centrifugar a 12,000 rpm por 12 min a 4°C.
17. Eliminar sobrenadante.
18. Suspender la pastilla en 20 µL de TE.
19. Dejar a baño maría a 56°C por 20 min.
20. Congelar hasta su uso.

#### **Dilución de las muestras**

1. Agregar a la muestra 100 µL de TE.
2. Poner en baño maría 15min.
- 3.- Homogeneizar.
4. Poner en baño maría 5 min.

5. En un tubo nuevo poner 5  $\mu$ L de la muestra, agregar 45  $\mu$ L de agua inyectable y centrifugar.

### **Purificación del ADN**

1. Tomar 30  $\mu$ L de la muestra y ponerlos en un tubo de 0.5 ml.
2. Añadir 200  $\mu$ L de solución I (0.1 m TRIS HCl pH 6.4 0.2 m EDTA pH 8.0).
3. Añadir 30  $\mu$ L de silica y homogeneizar la muestra.
4. Centrifugar 30 segundos a 10,500 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet que queda.
6. Añadir 200  $\mu$ L de etanol al 70% y homogeneizar.
7. Centrifugar 30 segundos a 10,500 rpm.
8. Eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet.
9. Añadir 150  $\mu$ L de acetona y homogeneizar.
10. Centrifugar 30 segundos a 10,500 rpm.
11. Eliminar el sobrenadante sin tocar el pellet.
12. Incubar a 37°C para que se evapore la acetona.
13. añadir 30  $\mu$ L de Agua Inyectable y homogeneizar (Vortex).
14. incubar a 37°C para que se evapore la acetona.
15. Centrifugar 30 segundos a 10,500 rpm.
16. Tomar 45  $\mu$ L del sobrenadante y transferir a un tubo de 0.5 ml (ahí se encuentra el ADN).
17. Verificar la integridad del ADN por medio de una Electroforesis en gel de agarosa.

### **Electroforesis**

Para comprobar que la extracción del ADN ha sido exitosa, se utiliza la electroforesis en gel de agarosa, esta es una de las metodologías más utilizadas para el trabajo con ácidos nucleicos. La electroforesis consiste en la migración de partículas a través de un campo electromagnético, donde la agarosa funciona como un filtro, separando fragmentos en función de su tamaño y el grupo fosfato responsable de la carga negativa, hará que los fragmentos migren hacia el lado positivo (ánodo) al aplicar una carga eléctrica. La separación de las moléculas dependerá de la concentración de la agarosa en el gel y el voltaje aplicado, a

mayor concentración de la agarosa menor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Asimismo, el incremento del voltaje aumenta la velocidad de migración de los fragmentos en el gel (Fierro, 2014).

Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y se solidifican. La agarosa utilizada comúnmente se disuelve en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifica a 30-35°C.

### **Material**

- 1.-Micropipetas.
  - 2.-Puntas.
  - 3.-Cinta adhesiva.
  - 4.- Pipeta de 10 ml.
  - 5.- Peine para gel de agarosa.
  - 6.- vidrio rectangular.
  - 7.- Nivelador de burbuja.
  - 8.- Buffer o solución tampón TAE (Tris-Acetato EDTA) a una concentración de 1x.
  - 9.- Agarosa a una concentración de 0.8 %
  - 10.-Buffer de carga de alta densidad con colorante.
  - 11.- Cámara de electroforesis
  - 12.- Fuente de poder.
  13. solución con bromuro de etidio 0.8 µg/ml.
- 3-Fotodocumentador.

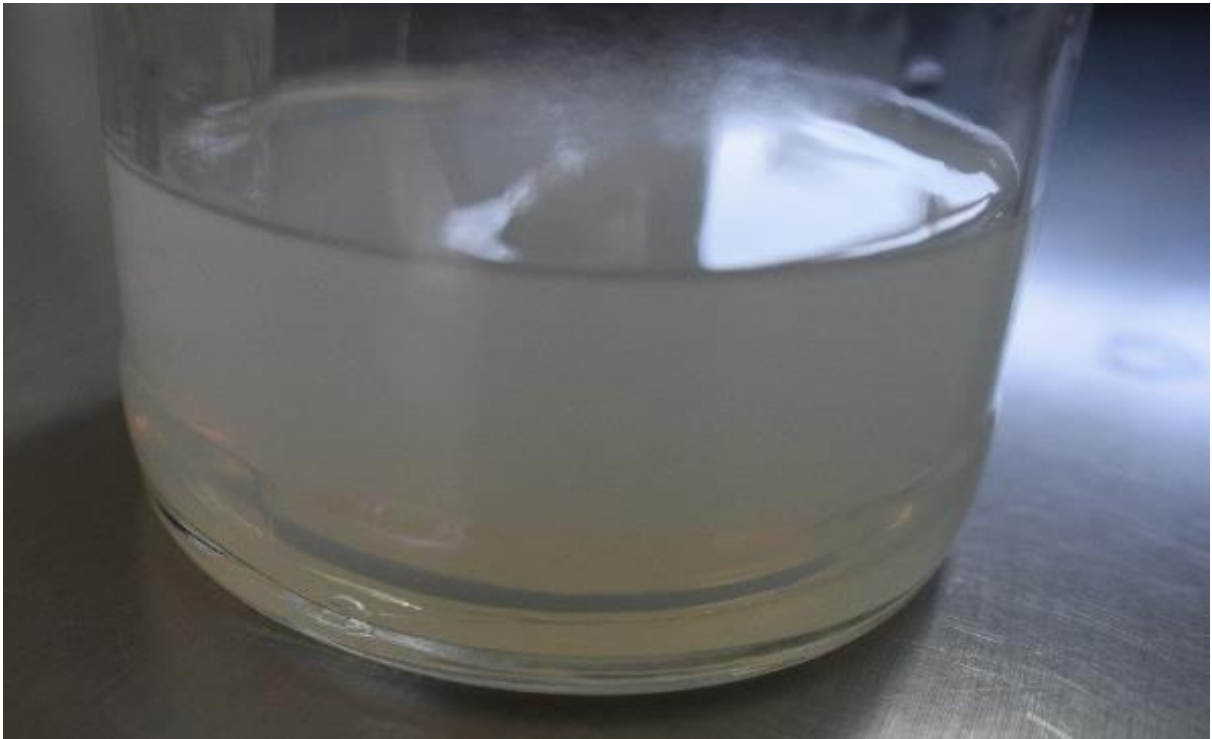
**Preparación de la agarosa para electroforesis (8%). La concentración de la agarosa a preparar dependerá de las moléculas a separar, entre menor sea el tamaño de la molecula la concentración de agarosa debe ser mayor y viceversa.**

1. Pesar .4g de agarosa.
1. En un frasco añadir 50ml de TAE en una concentración final de 1x y
2. Marcar el frasco hasta donde llegue la solución.
3. Calentar en el microondas por lapsos de 30 segundos hasta deshacer todo el soluto (la solución debe quedar transparente).



4.- En caso de que la solución estuviera por debajo de la marca, se rellena con TAE hasta el volumen inicial.

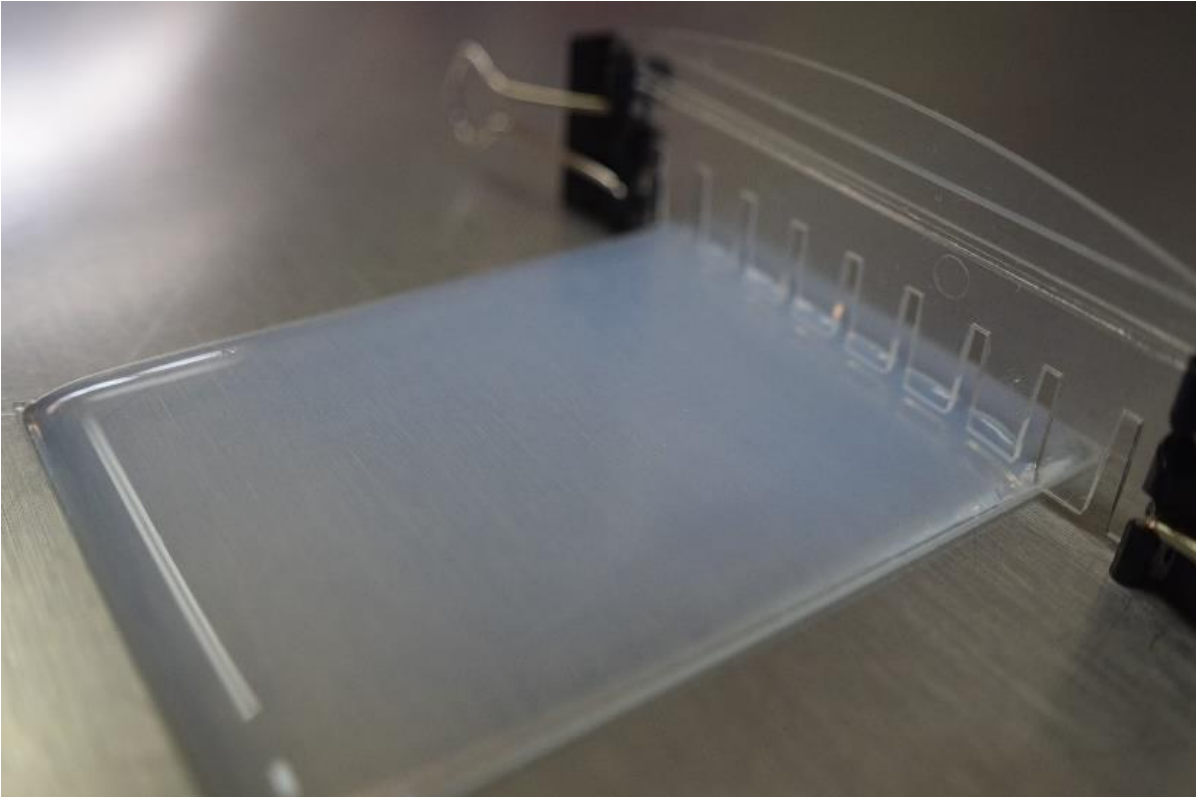
**Figura 32. Agarosa solidificada al preparada al 8%.**



### **Gel de agarosa**

1. Tomar un vidrio rectangular y un peine para geles de agarosa.
2. Limpiar con alcohol al 70% el área a ocupar.
3. Con un nivelador buscar un espacio sin irregularidades.
4. Colocar el vidrio y ajustar el peine en el espacio nivelado.
5. Calentar la agarosa en el microondas hasta que llegue a su estado líquido.
6. Con una pipeta tomar aproximadamente 10 ml de agarosa.
7. Verter la agarosa con mucho cuidado sobre el centro del vidrio tratando de que no se salga por los lados.
8. En caso de que queden burbujas, estas se pueden absorber acercando la punta de la pipeta.
9. Dejar que se solidifique la agarosa.
10. Retirar el peine con cuidado de no dañar el gel.

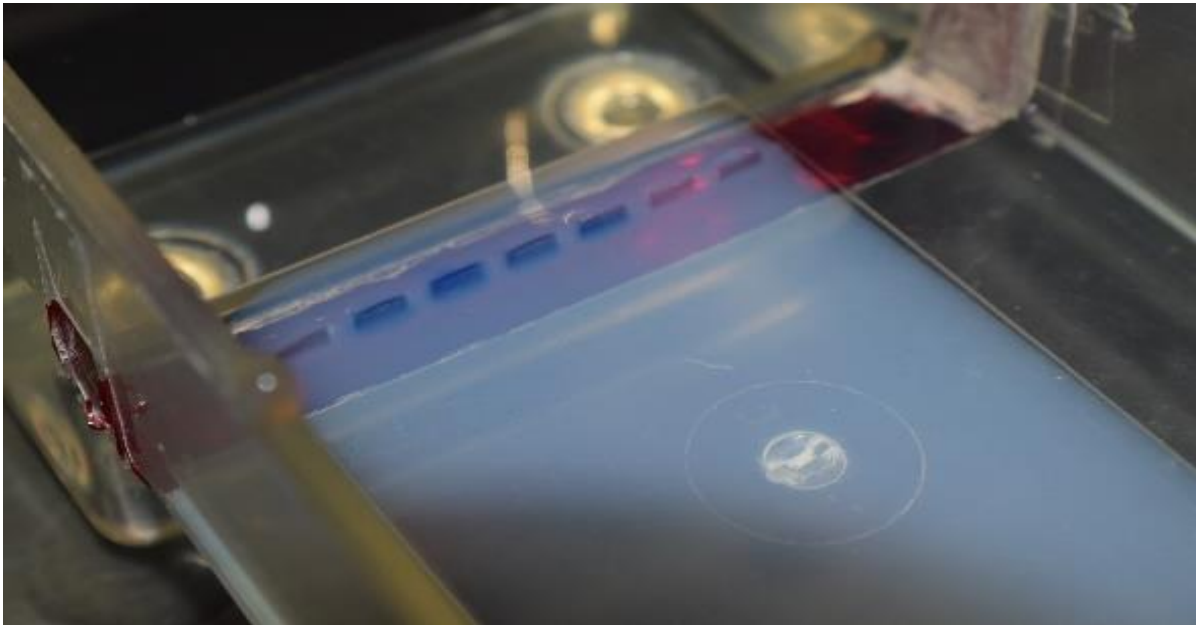
**Figura 33. Gel de agarosa solidificado de 6 pozos.**



### **Carga de las muestras**

1. Colocar el gel solidificado en la cámara de electroforesis.
  2. Llenar la cámara con el buffer (TAE) hasta que el gel quede sumergido.
  3. Colocar un pedazo de cinta adhesiva sobre una superficie plana
  4. Con una micro pipeta colocar 3  $\mu$ L del buffer de carga sobre la cinta.
  - 5.- Cambiar la punta de la micropipeta, tomar 2 ml de la muestra y homogeneizar con el buffer.
- 3.- Vaciar la mezcla del buffer y la muestra en un pozo del gel.

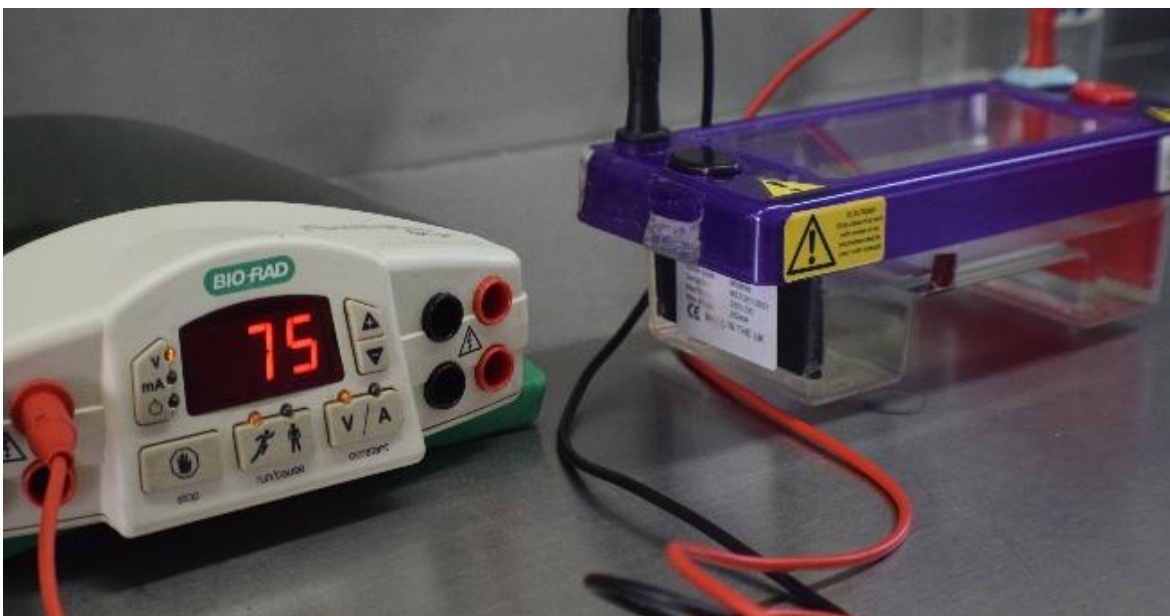
**Figura 34. Gel de agarosa al 8% inmerso en una cámara de electroforesis cargado con cuatro muestras y un marcador de peso molecular.**



### **Fuente de poder**

Una vez que el gel está cargado dentro de la cámara de electroforesis, se conecta la fuente de poder y se ajustan los parámetros a lo requerido, el gel debe correr por medio de un campo eléctrico uniforme y constante.

**Figura 35. Fuente de poder conectada a una cámara de electroforesis.**



### **Tinción del gel en solución de Bromuro de etidio**

Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se usa como colorante fluorescente, este absorbe la luz ultravioleta con una longitud de onda de 300nm produciendo fluorescencia, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel. Es importante mencionar que el bromuro de etidio es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que su manipulación deberá realizarse con mucha precaución.

Una vez terminada la electroforesis el gel debe teñirse para su visualización con una solución de 0.8 µg/ml de bromuro de etidio.

- 1.- Con mucho cuidado el gel debe separarse del vidrio y sumergirse en la solución de bromuro de etidio previamente preparada por al menos 10 minutos.
- 2.- Transcurridos los 10 minutos, el gel debe ser retirado con cuidado con ayuda de una espátula y llevado al fotodocumentador para su visualización.

### **Selección de los microsatélites**

Para la investigación básica en genética, biología de poblaciones y ecología reproductiva de los cocodrilos, se ha desarrollado diferentes metodologías, sin embargo, los estudios con marcadores moleculares microsatélites han resultado ser más eficientes que otros métodos para responder preguntas concernientes a la diversidad genética y parentesco en poblaciones silvestres y cautivas, debido a que estos marcadores suelen ser altamente polimórficos y susceptibles de análisis automatizado (Glen et al., 1998). En diversos estudios con cocodrilos, se han empleado enfoques genéticos tradicionales (proteínas e isoenzimas), los cuales han resultado ser limitados, revelando muy bajos niveles de variabilidad intrapoblacional, de tal modo que, existe la necesidad de contar con marcadores genéticos confiables que posean un alto grado de polimorfismo. Ante tal situación, Glen *et al.* en (1998), aislaron y caracterizaron *loci* microsatélites de caimán americano (*Alligatore mississippiensis*) con el propósito de comprobar si estos resultaban útiles para estudios genéticos en esta especie. Los microsatélites

aislados, mostraron un polimorfismo mayor que cualquier clase de marcador genético utilizado anteriormente en cocodrilos, además de altos niveles de variabilidad intra e interpoblacional, demostrando así, su utilidad para estudios genéticos en caimanes. Desafortunadamente, también pudieron constatar que, muchos de los *loci* no se conservan o no presentan polimorfismos en otras especies de cocodrilidos., por lo que es necesario, el desarrollo de microsatélites específicos para la especie en estudio, lo cual representa un incremento del tiempo y costo de la investigación. Sin embargo, diferentes investigadores (Dever y Densmore, 2001; FitzSimmons et al., 2000), han realizado con éxito la amplificación de marcadores microsatélites en especies cruzadas, demostrando así la existencia de marcadores homólogos entre especies de cocodrilidos, lo cual hace posible el uso de bibliotecas de cebadores desarrolladas para especies relativamente distantes, siempre y cuando, estas pertenezcan a especies de la misma familia, debido a que gran parte de los microsatélites no se conservan entre familias (Vendramin et al., 1996; FitzSimmons et al., 2000).

El uso de marcadores en especies cruzadas, ha sido comprobado por diversos autores en la mayoría de las especies de cocodrilianos, con mejores resultados entre más cercana sea la especie, esto representa una gran ventaja pues no es necesario el desarrollo de marcadores específicos para una especie determinada. La elección de los primers dependerá de la especie en estudio, de tal modo que la primera opción es verificar si se han desarrollado primers para dicha especie, de ser así, no habrá mayor problema que mandar sintetizarlos en algún laboratorio. De no existir los primers, se debe buscar en la literatura aquellos que han sido desarrollados para alguna especie de la misma familia, por ejemplo si se requieren microsatelites para *C.moreletii*, estos no han sido desarrollados como tal, sin embargo Fitzimmons et al., (2000) aisló *loci* microsatelites para especies de la Familia Crocodylidae (*C. porosus*, *C. Jhonstoni* y *C. acutus*) y posteriormente Dever y Densmore (2001), los probaron con éxito en dicha especie.

**Cuadro 19. El cuadro muestra los microsatélites desarrollados para las diferentes especies de cocodrilianos y especies en las que han sido probados.**

<b>Desarrollado para la especie</b>	<b>Probado con éxito en:</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Autor</b>
<i>Alligator mississippiensis</i>	<i>Alligator sinensis</i>	<i>Am<math>\mu</math></i>	Glenn <i>et al.</i> , 1998
<i>Crocodylus johnstoni</i> <i>Crocodylus porosus</i> <i>Crocodylus acutus</i>	En especies <i>crocodilidae</i>	<i>Cj</i> <i>Cp</i> <i>CU</i>	Fitzimmons <i>et al.</i> , 2000
<i>Caiman latirostris</i>	Caiman crocodilus Caiman yacaré Paleosuchus palpebrosus	<i>Cl<math>\mu</math></i>	Zucoloto <i>et al.</i> , 2002
<i>Crocodylus siamensis</i>		CS	Chaeychomsri <i>et al.</i> , 2008
<i>Crocodylus porosus</i>	En especies <i>crocodilidae</i>	<i>Cp</i>	Miles <i>et al.</i> , 2008
<i>Crocodylus palustris</i>	Paleosochus frigonatus Alligator mississippiensis Crocodylus rhombifer Gavialis gangeticus Caiman crocodylus Tomistoma schlegelii Osteolaemus tetraspis Crocodylus acutus Crocodylus cataphractus	<i>CpSSR</i>	Aggarwal <i>et al.</i> , 2015

Una vez que se determina la especie objetivo de la investigación, se debe hacer la elección de los primers, recordando que entre más cercanas sean las familias más funcionales serán estos si la especie para la que se desarrollaron los marcadores es diferente.

**Cuadro 20. Clasificación del orden Crocodylia y las especies pertenecientes a cada familia (Ross, 1998; Casas-Andreu, 2013)**

<b>Alligatoridae</b>	<b>Crocodylus acutus</b> (American crocodile)
<b>Alligator mississippiensis</b> (American alligator)	<b>Crocodylus cataphractus</b> (slender-snouted crocodile)
<b>Alligator sinensis</b> (Chinese alligator)	<b>Crocodylus intermedius</b> (Orinoco crocodile)
<b>Caiman Crocodylus</b> ( <i>C.c.fuscus</i> , <i>C.c. apaporiensis</i> , <i>C.c. chiapasus</i> )	<b>Crocodylus johnsoni</b> (Australian freshwater crocodile)
<b>Caiman latirostris</b> (broad-snouted caiman)	<b>Crocodylus mindorensis</b> (Philippine crocodile)
<b>Caiman yacare</b> (yacaré)	<b>Crocodylus moreletii</b> (Morelet's crocodile)
<b>Melanosuchus niger</b> (black caiman)	<b>Crocodylus niloticus</b> (Nile crocodile)
<b>Paleosuchus palpebrosus</b> (dwarf caiman)	<b>Crocodylus palustris</b> (mugger)
<b>Crocodylidae (Crocodylinae)</b>	<b>Osteolaemus tetraspis</b> (dwarf crocodile)
<b>Paleosuchus trigonatus</b> (smooth-fronted caiman)	<b>Crocodylidae (Tomistominae)</b>
<b>Crocodylus novaeguineae</b> (New Guinea Crocodile)	<b>Tomistoma schlegelii</b> (tomistoma)
<b>Crocodylus porosus</b> (saltwater crocodile)	<b>Gavialidae</b>
<b>Crocodylus rhombifer</b> (Cuban crocodile)	<b>Gavialis gangeticus</b> (gharial)
<b>Crocodylus siamensis</b> (Siamese crocodile)	



## PCR

Para preparar la reacción, es necesario que el procedimiento se lleve a cabo en una campana de flujo con previamente esterilizado material estéril y que las micropipetas a utilizar sean destinadas solo para este proceso, con el fin de evitar posibles contaminaciones.

**Figura 36. Campana de flujo para PCR.**



### **Preparación de la reacción**

Volumen final 15 µl por reacción.

1. Agregar 5.5 µl de H<sub>2</sub>O
2. Agregar 1.5 µl de Buffer y homogeneizar
3. Agregar 2.0 µl (1.5 UI) de la Enzima ADN polimerasa y homogeneizar
4. Agregar 1.5 µl de dNTP's y homogeneizar
5. Agregar 1 µl del Primer F y homogeneizar
6. Agregar 1µl Primer R y homogeneizar
7. Agregar 1.0 µl DNA y homogeneizar
8. Agregar 1.5 µl MgCl y homogeneizar

Las puntas deben cambiarse cada que se utiliza un reactivo para evitar la contaminación de los mismos.

### **Condiciones de tiempo y temperatura para el termociclador**

Las condiciones para llevar a cabo la PCR cambiaran de acuerdo con los primers utilizados, una vez que se estandariza el método, es importante que todas las reacciones se lleven a cabo en un mismo termociclador pues, si se llega a cambiar de aparato, se corre el riesgo de que la temperatura pueda diferir entre uno y otro, lo que originaría que el método tenga que ajustarse nuevamente.

1. Temperatura inicial 94°C por 5min
2. 35 Ciclos
  - 2.1 Desnaturalización 94°C por 30 segundos.
  - 2.2 Alineamiento 30 segundos (la temperatura dependerá de lo requerido por cada primer).
  - 2.3 Extensión 72°C por 50 segundos.
3. 72°C por 5min
5. Temperatura final 4°C.

Posterior a la amplificación de los productos, al igual que con el ADN se debe corroborar el éxito de la reacción por medio de electroforesis en gel de agarosa y visualizarse en un fotodocuemtnador, el procedimiento es similar la antes

mencionado, solo cambiara la concentración de la agarosa y el marcador de peso molecular.

Una vez que se tienen los productos de las amplificaciones de todos los microsatélites utilizados, estas deben ser enviadas a un laboratorio especializado para su estudio en un analizador de Fragmentos.

## **Análisis de los datos**

### **Peak Scanner 2.0**

Descargar e instalar **Peak Scanner 2.0**

Por medio de este programa se analizan los alelos obtenidos con base en su peso molecular y la intensidad de la señal generada por la fluorescencia emitida de los marcadores moleculares, dando como resultado el tamaño de cada uno de los alelos en decimales. Este número se redondea a un entero por medio del software **TANDEM**.

**TANDEM** (Matschiner y Salzburger, 2009)

Este programa redondea los tamaños decimales de los microsatélites por medio de un algoritmo.

#### **1.- base de datos (convert).**

<b>(1)cocodrilo</b>				
<b>(2)npops=3</b>				
<b>(3)nloci=7</b>	<b>(6) 2</b>		<b>2</b>	
	<b>(7) CJ109</b>		<b>CJ35</b>	
<b>(4)Pop=PopA</b>	<b>(8) 364,4634</b>	<b>368,2445</b>	<b>165,6062</b>	<b>158,0795</b>
<b>(5)Pop=PopB</b>				

La base de datos se debe guardar como delimitado por tabulaciones con terminación.txt y pegarse en el escritorio.

- 1= Cometario o nombre del archivo de datos.
- 2= Número de poblaciones.
- 3= Número de loci (microsatelites).
- 4,5= ID de las poblaciones sin espacios (PopA, PopB, Pop1, Pop2..).
- 6= Se especifica que los datos son de organismos diploides (2).
- 7= ID del microsatélite.
- 8= Tamaño en decimales del alelo 1.
- 9= Tamaño en decimales del alelo 2.

## 2. Descargar e instalar tándem

<http://evolution.unibas.ch/salzbunger/software/tandem.htm>

- Descomprimir tandem.source
- Pegar la carpeta descomprimida en el escritorio

## RUBY

3. Descargar Ruby ver 2.4 (Rubyinstaller.org).

[www.ruby-lang.org/en/news/2016/12/25/ruby-2-4-0-released/](http://www.ruby-lang.org/en/news/2016/12/25/ruby-2-4-0-released/)

- Seleccionar el archivo Ruby 2.4 3-2(86x).
- Instalar Ruby.
- Abrir el acceso: **Start Command Prompt With Ruby.**
- Acceder al escritorio: **chdir desktop**
- Abrir el archivo a analizar: **ruby tandem.rb -i** (*nombre del archivo incluyendo la terminación .txt*)

## STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000)

1.-Base de datos

Para crear la base de datos en STRUCTURE se deben colocar los tamaños de los alelos en forma vertical como se muestra en la imagen.

	<b>(3) CJ109</b>	<b>CJ20</b>	<b>CJ131</b>
<b>(1) 4</b>	<b>(4) 325</b>	<b>192</b>	<b>210</b>
<b>(2) 4</b>	<b>(5) 322</b>	<b>191</b>	<b>209</b>
<b>6</b>	<b>324</b>	<b>193</b>	<b>211</b>
<b>6</b>	<b>325</b>	<b>190</b>	<b>211</b>

1,2 = ID muestra (sin letras).

3= ID microsatélite.

4= Tamaño alelo 1 (Redondeado).

5= Tamaño alelo 2 (Redondeado).

La base de datos se debe guardar como delimitado por tabulaciones con terminación .txt.

Descargar e instalar **STRUCTURE**

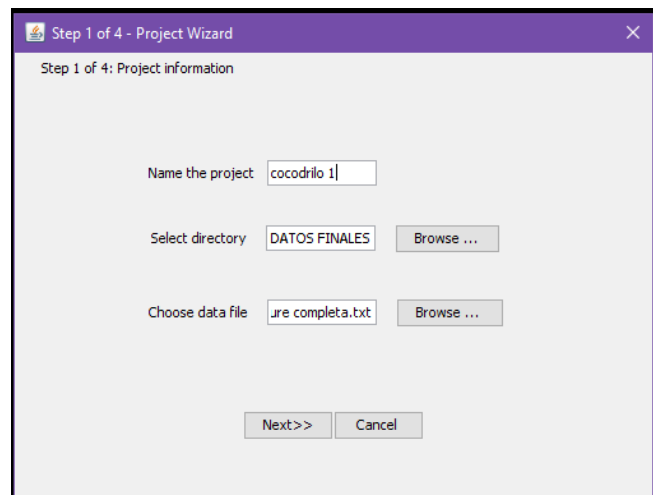
**1. En el menú seleccionar:**

NEW PROJECT

**Paso 1**

1.- Nombre del proyecto

2.- Guardar resultados



### 3.- Base de datos

NEXT

#### Paso 2

1.- Número de individuos

2.- Diploide

3.- Número de loci

4.- Valores perdidos (0)

Se utiliza el valor -1

NEXT

Step 2 of 4 - Project Wizard

Step 2 of 4: Information of input data set

Number of individuals: 82

Ploidy of data: 2

Number of loci: 7

Missing data value: -1

Show data file format

<<Back Next>> Cancel

#### Paso 3

1. Seleccionar solo la opción:

Row of marker names

2. NEXT

Step 3 of 4 - Project Wizard

Step 3 of 4: Format of input data set

Please check box if data file contains following row(s):

Row of marker names

Row of recessive alleles

Map distances between loci

Phase information

Special format

Data file stores data for individuals in a single line

Show data file format

<<Back Next>> Cancel

#### Paso 4

1. Seleccionar solo la opción:

Sampling location information

2. FINISH

Seleccionar la opción:

PROCEED en la pantalla que aparece.

Step 4 of 4 - Project Wizard

Step 4 of 4: Format of input data set (cont'd)

Please check box if data file contains following column(s):

Individual ID for each individual

Putative population origin for each individual

USEPOPINFO selection flag

Sampling location information

Phenotype information

Other extra columns

Number of Extra Columns:

Show data file format

<<Back Finish Cancel

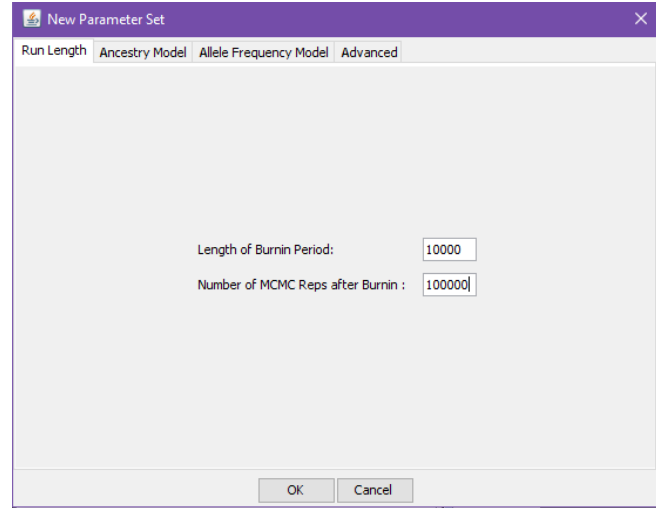
**2.- En el menú, seleccionar:**

PARAMETER SET

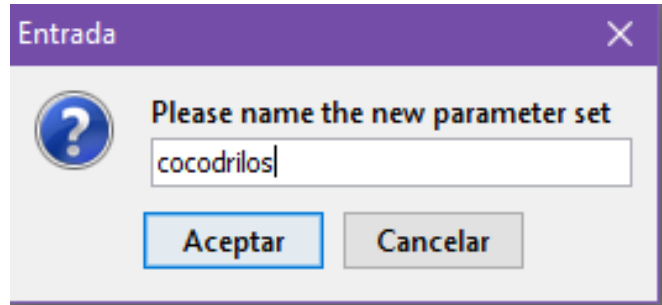
NEW

1.- Número de interacciones antes de tomar en cuenta las poblaciones

2.- Número de repeticiones MCMC



**NOMBRAR EL PROYECTO**



**3.-Seleccionar en el menú:**

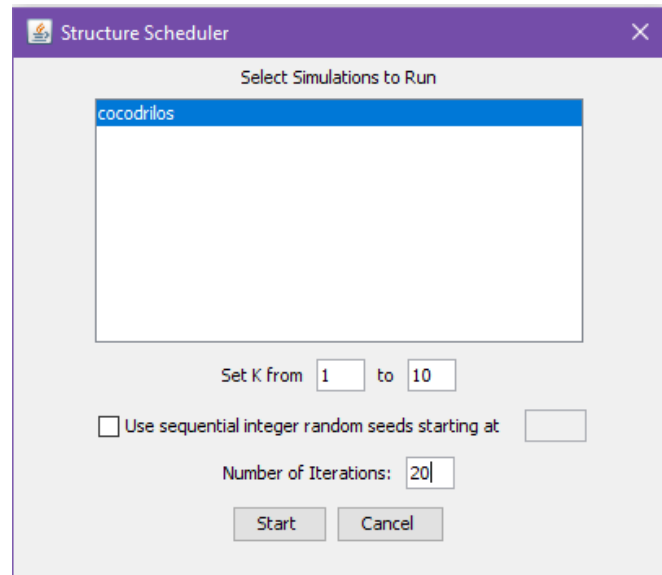
PROYECT

STAR A JOB

1.- seleccionar el nombre del proyecto

2.- seleccionar el rango de K

3.- Elegir el número de interacciones





Una vez finalizado el análisis, los datos se encontrarán en la carpeta seleccionada previamente, estos deberán comprimirse en un archivo **ZIP**.

### **Harvester structure (Earl y vonHoldt, 2012)**

Los datos obtenidos deberán subirse en un archivo ZIP y cargarse en la página: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>.

### **GEN ALEX (Peakall and Smouse 2006, 2012)**

#### **1.- Abrir la página:**

<http://biology-assets.anu.edu.au/GenALEx/Welcome.html>

#### **2.- Descargar:**

GenALEx 6.51b1 Download and Documentation (zip 6.4 mb)

**3.- Descomprimir la carpeta y seleccionar el archivo de Excel GenALEx 6.503, se abrirá una hoja de cálculo y el programa aparecerá como un complemento de Excel.**

Base de datos:

(1) 7	(2) 82	(3) 3	(4) 30	(5) 22	(6) 30		
(10)COCODRILO			(7) SF	(8) LC	(9)CIC		
(11)SAMPLE No	(12) POP	(13)CJ109		CJ20		CJ18	
4	SF	(14) 179	(15)175	165	167	193	209
27	LC	175	178	165	158	193	209
365	CIC	178	178	167	158	193	208

1= Número de loci

2= Número de muestras

3= Número de poblaciones

4= Número de muestras en la población 1

5= Número de muestras en la población 2

6= Número de muestras en la población 3

7, 8,9= ID de las poblaciones

10= ID del proyecto

11= ID d la muestra

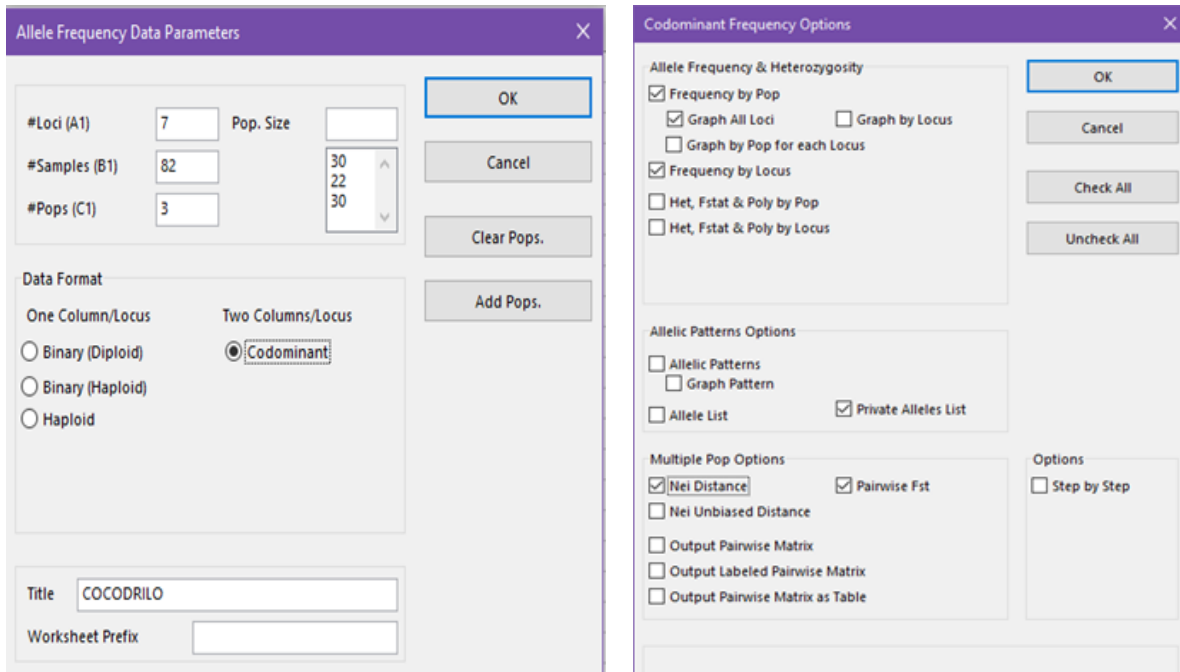
12= ID de la muestra por población

13= ID loci

14= Tamaño alelo 1

15= Tamaño alelo 2

**4.- Abrir el archivo que contiene la base de datos y utilizar el complemento GenALEx para los análisis requeridos.**



**NOTA: se deben habilitar macros para poder usar el programa.**

**GENEPOP** (Raimond y Rousset, 1995; Rousset, 2008)

- 1.- Descargar Genepop versión 4.7.0
- 2.- Descomprimir y abrir el archivo exe
- 3.- Ubicar el archivo a analizar en el escritorio
- 4.- Una vez abierta la ventana del archivo genepop.exe, solo especificar el nombre del archivo y presionar ENTER, si el nombre se escribió correctamente aparecerán los *loci* a analizar.
5. Presionar ENTER para que aparezca el menú de selección.

Para crear la base de datos se deben conjuntar los 2 tamaños de los alelos en una sola columna como se muestra en la imagen. En la primera fila se coloca el nombre del proyecto y en las siguientes filas el ID de los *loci* a analizar, la identificación de las muestras se limita a la población a la que pertenecen.

El archivo debe tener un formato de texto.

```

basegenepop: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
Title line:"microscocodrilo"
cj109
cj119
cj20
cj35
cj16
cj18
cj131
pop
pop1, 000000 182180 155161 166158 134132 192194 209195
pop1, 000000 176178 161161 164158 134152 192194 209195
pop1, 364368 182180 161161 164158 134132 192194 195195
pop1, 000000 000000 161157 164158 134132 194194 209195
pop1, 000000 174174 161161 164158 134152 192194 195195
pop1, 368366 176178 161161 164158 134152 192194 195195
pop1, 000000 178178 161157 164158 134152 192194 195195
pop1, 362362 176182 149155 164158 134132 192194 209195
pop1, 000000 178178 161149 164158 134134 194194 195195

```

```

Largest allele index detected:
cj109      : 378
cj119      : 182
cj20       : 173
cj35       : 166
cj16       : 152
cj18       : 194
cj131      : 215

```

```
C:\Users\locky\Desktop\genepop.exe
Genepop version 4.7.0
Current input file: gpop2mch.txt
Last read at date: 4-5-2018, time: 14:55:51
-----> Change Data ..... C
Testing :
  Hardy-Weinberg exact tests (several options) ..... 1
  Exact tests for genotypic disequilibrium (several options) ..... 2
  Exact tests for population differentiation (several options) ..... 3
Estimating:
  Nm estimates (private allele method) ..... 4
  Allele frequencies, various Fis and gene diversities ..... 5
  Fst & other correlations, isolation by distance (several options).. 6
Ecumenicism and various utilities:
  Ecumenicism: file conversion (several options) ..... 7
  Null alleles and miscellaneous input file utilities ..... 8
QUIT Genepop ..... 9
Your choice? :
```

Los archivos aparecerán en el escritorio.

Seleccionar por medio de las teclas numéricas el análisis que se desea hacer con los datos de la población

### **MICRO-CHECKER**

Descargar e Instalar MICRO-CHECKER.

#### 1.-Base de datos

La base de datos que se utiliza es similar a la generada para GENEPOP, pero se debe cambiar el formato del archivo en el mismo programa.

#### 2.-Cambiar al formato del archivo en GenePop.

##### **1. Abrir GENEPOP.**

2. Abrir el archivo que contiene la base de datos (es la misma que se utilizó en genepop).

3.-Abrir el menú y seleccionar la opción: Ecumenicism and Various utilities

Null alleles and miscellaneous input file utilities (8).

```

Seleccionar C:\Users\locky\Desktop\genepop.exe
Genepop version 4.7.0

Miscellaneous :
  Null allele: estimates of allele frequencies ..... 1
  Diploidisation of haploid data ..... 2
  Relabeling alleles ..... 3
  Conversion to individual data with population names ... 4
  Conversion to individual data with individual names ... 5
  Random sampling of haploid genotypes from diploid ones 6

  Main Menu ..... 7
2

Normal ending.
The file Dbasegenepop.txt is ready
(Return) to continue

```

4.-En Miscellaneous se debe seleccionar la opción Diploidisation of haploid data, utilizar esta opción nos dará como resultado el cambio de formato necesario para Utilizar en MICRO-CHECKER. El archivo debe tener una D inicial y terminación txt..

5.-Ya en MICRO-CHECKER se debe abrir el archivo obtenido en GENEPOP.

6.- Aparecerá una ventana en la que se deben completar algunos datos para cada una de las poblaciones.



7.-una vez que se completan los datos se debe elegir la opción TOOLS y seleccionar la opción Analyse Data.

### COANCESTRY (Wang,2011)

1.-Descargar e instalar COANCESTRY

<https://www.zsl.org/science/software/coancestry>

Se debe llenar un formulario en la página para poder acceder a la descarga.

2.-Base de Datos.

La base de datos se realiza en EXCEL de la siguiente manera:

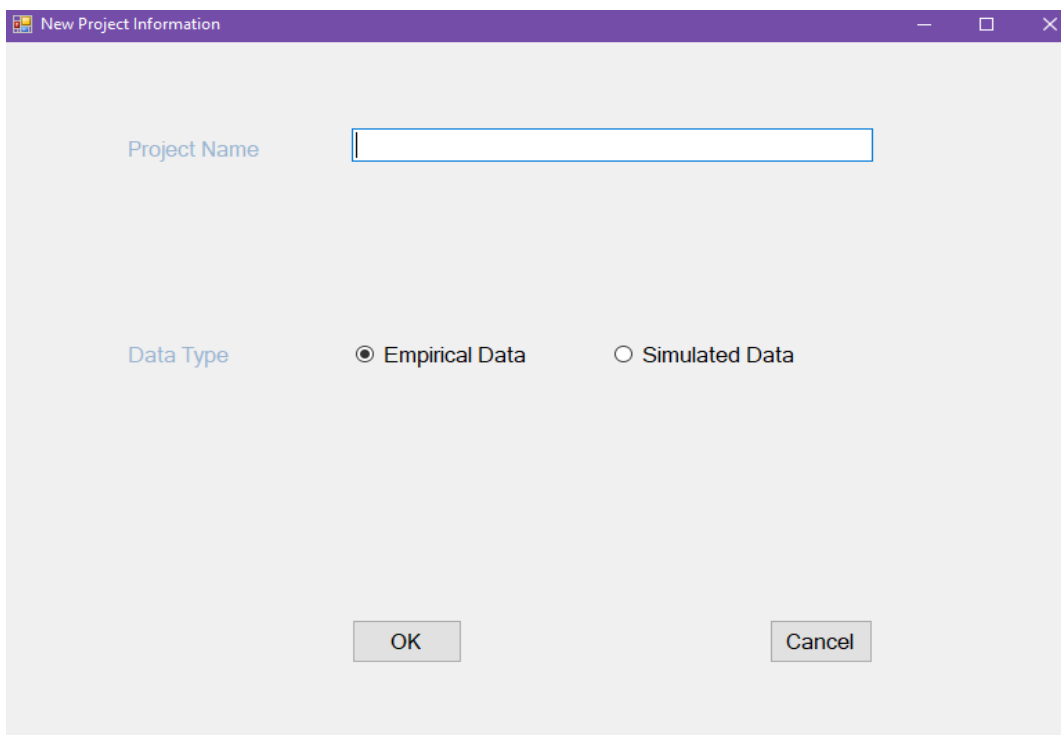
La columna A contiene el ID de las muestras especificando la población, la columna B contiene el tamaño del primer alelo y la columna c el tamaño del segundo alelo para el mismo locus y así para todos los *locus* a analizar.

	A	B	C	D	E
1	sf4	0	0	182	180
2	sf6	0	0	176	178
3	sf9	364	368	182	180
4	sf11	0	0	0	0
5	sf16	0	0	174	0
6	sf21	368	366	176	178
7	sf23	0	0	178	178

El archivo se debe guardar como archivo de texto.txt delimitado por tabulaciones.

3.-Abrir el programa y seleccionar NEW PROYECT.

4.- Nombrar el proyecto y seleccionar EMPIRICAL DATA.

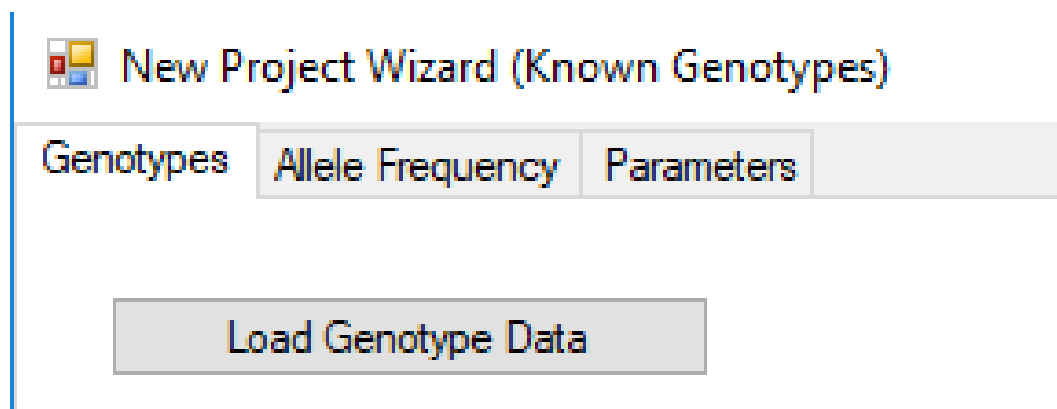


The image shows a software dialog box titled "New Project Information". It has a purple header bar with standard window controls (minimize, maximize, close). The main area is light gray and contains the following elements:

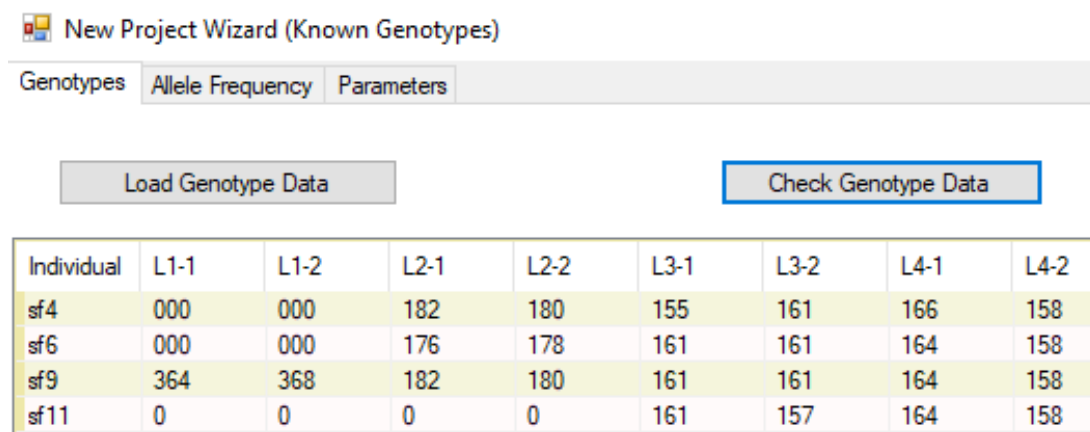
- A label "Project Name" followed by a white text input field with a blue border.
- A label "Data Type" followed by two radio button options: "Empirical Data" (which is selected) and "Simulated Data".
- At the bottom, there are two buttons: "OK" and "Cancel".



5.- Cargar el archivo txt (Load Genotype Data).

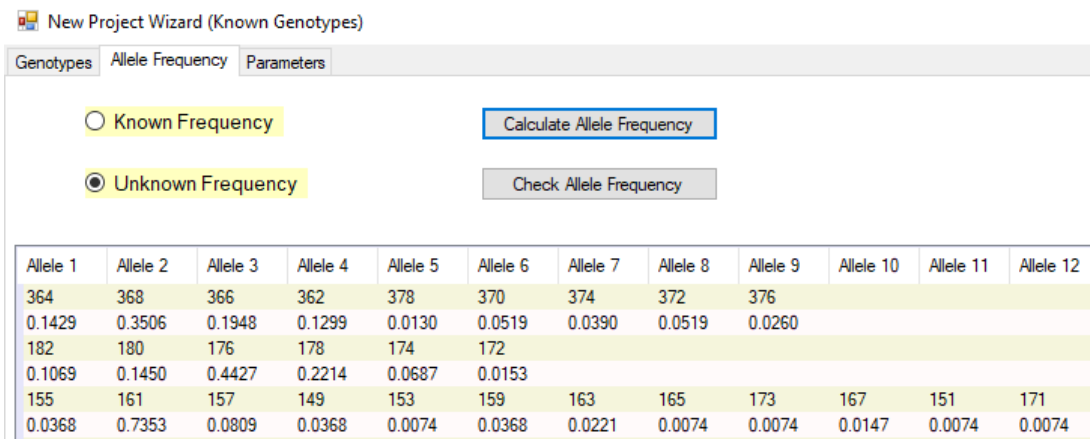


6.- Seleccionar Check Genotype Data.



7.- Escoger la pestaña Allele Frequency y ahí utilizar la opción UNKNOWN FREQUENCY.

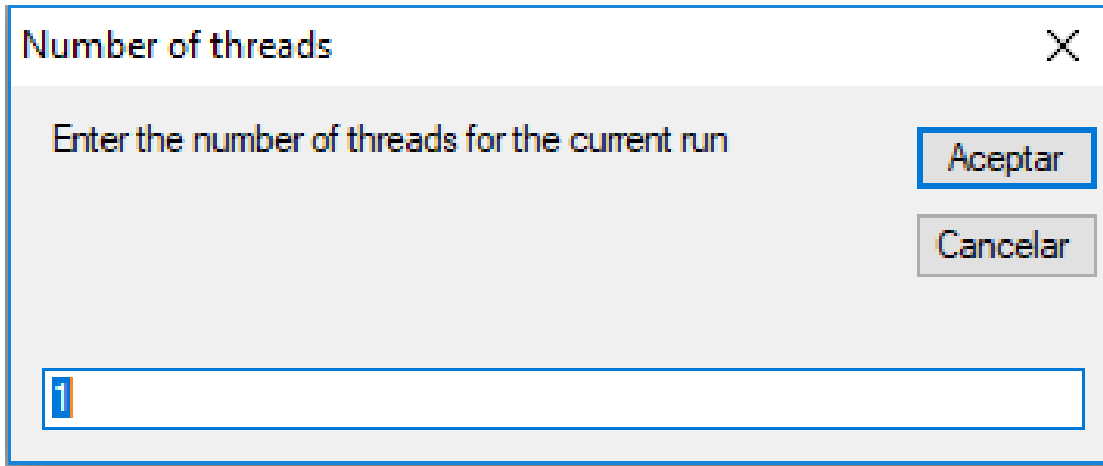
8.- Calculate Allele Frequency.



9.- Check Allele Frequency.

10.-Parameters (Check and Save).

11.-Elegir la opcion RUN en el menu y Star Runing (\*).



1 y 2 son distintos niveles de confianza en los análisis

10.- View Results.

Descargar e instalar **DplotJr** para tener la opción de graficar en COANCESTRY.

<https://dplot-jr.soft112.com>.

## 4.7 Literatura citada

[http://www.laboratoriouniversal.com/biblioteca/zoetil\\_tabla\\_dosis.pdf](http://www.laboratoriouniversal.com/biblioteca/zoetil_tabla_dosis.pdf)

- Aggarwal, R. K., A. Lalremruata & B. Dubey 2014. Development of fourteen novel microsatellite markers of *Crocodylus palustris*, the Indian mugger, and their cross-species transferability in ten other crocodylians. *Conserv. Gen. Resour.* 7: 197–200.
- Álvarez del Toro M. & L. Sigler. 2001. Los Crocodylia de México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables (IMERNAR), PROFEPA. México. 1ª Ed. 134 pp.
- Ashley, M. V., M. F. Willson, O. R. Pergams, D. J. O'Dowd, S. M. Gende & J. S. Brown. 2003. Evolutionarily enlightened management. *Biological Conservation*, 111(2), 115–123.
- Balderas, S. A., L.G. Israel, B.V. Diana. 2014. Estudio Tipo Anexo Cría en Cautiverio *Crocodylus moreletii*. SEMARNAT-DGVS. México. 43pp.
- Bennett, R.A. A review of anesthesia and chemical restraint in reptiles. *J. Zoo. Wildlife Med.* 1991; 22(3): 282-303.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios y R. Macip. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Rev. Mex. Biodiv.* Vol. 82 No. 1 México.
- Casas-Andreu, G., G. Barrios, A. Escobedo-Galván y X. Aguilar-Miguel. 2013. Sinopsis de datos biológicos y ecológicos del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México. pp: 63.
- Cedillo-Leal, C., J. C. Martínez González, F. Briones Encinia, E. Cienfuegos Rivas, J. García Grajales. 2011. Importancia del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en los humedales costeros de Tamaulipas, México. *Cienc. UAT.* 21.3:18-23.
- Chabreck, H. R. 1963 Methods of capturing, marking and sexing alligators. Louisiana Wild Life and Fisheries Commission. Grand Chenier, Louisiana. Seventeenth Annual Conference Southeastern Association of Game and Fish Commissioners.
- Chaeychomsri, W., P. Tabthipwon, N. Noparatnaraporn and V. Siripholvat . 2008. Development of Microsatellite Markers for Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42. 2: 256-262.
- Cherkiss, M., H. E. Fling, F. J. Mazzotti, K. G. Rice y M. D. Conill. 2005. Contando y capturando cocodrilidos. CIR1451S, University of Florida IFAS Extension, Wildlife Ecology and Conservation Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 12 pp.

- Carrquiriborde, M. 2010. Enfermedades Zoonóticas asociadas a reptiles. Temas de Zoonosis IV. Vet. Arg, 27 (267)
- Dever, J. A. and L. D. Densmore. 2001. Microsatellites in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) and Their Utility in Addressing Crocodilian Population Genetics Questions. *Journal of Herpetology*, 35(3), 541-544.
- Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 .
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>) (traducción de la versión original en inglés, 2007).
- Fierro F. 2014. Electroforesis de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, SEMARNAT, pp.27-51.
- Fitzsimmons, N.S. Tanksley, M. R. Forstner, E. E. Louis, R. Daglish, J. Gratten, and S. Davis. 2000. Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. In G. Grigg, E Seebacher, and C. E. Franklin (eds.), *Crocodilian Biology and Evolution*, pp. 51-57.
- FitzSimmons, N.N., J.C. Buchan, P.V. Lam, G. Polet, T.T. Hung, N.Q. Thang, J. Gratten. 2002. Identification of Purebred *Crocodylus siamensis* for Reintroduction in Vietnam. *J. Exp. Zool.*, 294:373–381.
- Glenn T.C., Dessauer H.D., Braun M.J. 1998. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. *Copeia*, 1998, 591–601.
- Glenn, TC, J.L. Staton, A.T. Vu, L.M. Davis, J.R. Alvarado, W.E. Rhodes, L. Brisbin, R.H. Sawyer. 2002. Low Mitochondrial DNA Variation Among American Alligators and a Novel Non-coding Region in crocodilians. *J. Exp. Zool.*, 294: 373–381
- INE. 2000. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Crocodylia de México (COMACROM). Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Marina y Recursos Naturales, Distrito Federal, México.
- IUCN, 2010. Red List of Threatened Species, Version 2010.2. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources ( <http://www.iucnredlist.org>).
- Jacobson, E., R. 1984. Immobilization, blood sampling, necropsy techniques and diseases of crocodilians: a review. *J. of Zoo Anim. Med.* 15: 38-45.

- Mace, G.M., & Purvis, A. 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molec. Ecol.* 17:9-19.
- Martínez, S. A. 2008. Métodos actuales de identificación individual en reptiles. *Aprendiendo sobre reptiles. Animalia.* 211; 242-243.
- Matschiner M, W. Salzburger. 2009. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25.15. 1982-1983.
- Miles, L. G., S. L. Lance, S. R. Isberg, C. Moran , T. C.Glenn. 2008. Cross-species amplification of microsatellites in crocodylians: assessment and applications for the future. *Conserv. Gen.* 10.4: 935–954.
- Myburgh, J.G., R.M. Kirberger, J.C.A. Steyl, J.T. Soley, D.G. Boyse, F.W. Huchzermeyer, R.H. Lowers, L. J. Guillette. 2014. The postoccipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions', *Journal of the South African Veterinary Association* 85.1.
- Nevarez J.G, M.A. Mitchell, D.Y. Kim, R. Poston, H.M. Lampinen. 2005. West Nile Virus in alligator ranches from Louisiana. *J Herp Med Surg*, 15.3.4–9.
- NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos peligrosos.
- NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.
- Padilla, S. E., M. Weber, E. Jacobson 2009. Comparación de anticoagulantes de heparina de litio y sodio en la bioquímica plasmática del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletti*) en Campeche, México. *Vet. Méx.* 40: 203-211.
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6. 288-295.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28. 2537-2539.
- Pritchard, Stephens, Donnelly. 2000. *Genetics* 155:945-959. [STRUCTURE](#).
- Raymond M. & F. Rousset, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248-249

- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.
- Rojas, L. 2002. Anestesia en Reptiles. *Boletín Grupo de Estudio de Animales Silvestres (GEAS)*. Colombia. Volumen III, Núm. 1- 6, 34-37 pp.
- Reyes, G. J. 2009. Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos en el INMEGEN. Instituto Nacional de Medicina Genómica. México. 93 pp.
- Ross, J. P. 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2<sup>nd</sup> Edition. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK pp: 96
- Sánchez-Herrera, O., G. López-Segurajauregui, A. García-Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez-Díaz. 2011. Programa de monitoreo del Cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). México, Belice, Guatemala. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 270 pp.
- Sanchez, J. 2001. Estado de la población de cocodrilos (*Crocodylus acutus*) en el río Tempisque Guanacaste Costa Rica. Informe Final. Área de Conservación Tempisque. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica, 49 pp.
- Serna-Lagunes, R. 2010. Historia de vida y genética cuantitativa de cuatro poblaciones de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) bajo condiciones de cautiverio en el trópico mexicano. Maestría en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados. México Veracruz. 111 pp.
- Serna-Lagunes, R., D. González y P. Díaz-Rivera. 2012. Variabilidad genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae) mediante el uso de marcadores microsatelitales. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 60 (1): 425-436.
- Troiano, J. C. 2013. Colecta de Muestras Sanguíneas en Reptiles. Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional. Colombia.
- Vendramin, G.G., L. Lelli , P. Rossi, M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol. Ecol.* 5: 595-598.
- Zucoloto, R. B., L. M. Verdade, & L. L. Coutinho. 2002. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. *Journal of Experimental Zoology*, 294.4: 346–351.
- Wang, J. 2011. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11.1: 141-145.

