



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

TÍTULO DEL PROYECTO

Introgresión genética en la especie nativa *Crocodylus acutus* en los sistemas acuáticos del Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca México

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biól. GERARDO JESÚS SORIA ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Oscar Alberto Flores Villela
Facultad de Ciencias, UNAM
Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Instituto de Ecología, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. Noviembre, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

OFICIO CPCB/1064/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas, Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de julio de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SORIA ORTIZ GERARDO JESÚS** con número de cuenta **308207109** con la tesis titulada "**Introgresión genética en la especie nativa de *Crocodylus acutus* en los sistemas acuáticos del Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca México**", realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES**:

Presidente: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
Vocal: DR. PIERRE ALEXANDRE REMY ROBERT HENRI CHARRUAU
Secretario: DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
Suplente: DR. JOSÉ JUAN FLORES MARTÍNEZ
Suplente: DR. MARCO ALEJANDRO SUÁREZ ATILANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 2 de octubre de 2019.



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad y el apoyo para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por concederme la beca que, sin ella, no hubiera sido posible llevar a cabo mi proyecto de tesis.

Agradezco al Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en el Instituto de Biología de la UNAM. Se agradece la confianza, el apoyo, revisiones y orientación constante. Se le agradece el espacio en las instalaciones de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles para trabajar, al préstamo del material necesario para realizar mi trabajo de campo, a la compra de material de laboratorio y el haberme facilitado el permiso de colecta.

Agradezco a mi comité académico conformado por Dr. Oscar Flores Villela y el Dr. Daniel Piñero Dalmau, por su asesoría y consejos para culminar y mejorar el proyecto.

Los ejemplares y muestras colectadas fueron capturados con el permiso especial de colecta SEMARNAT SGPA/DGVS/04893/17, Ciudad de México, 14 de junio de 2017, otorgado al Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín, por formar parte de este proyecto, dándose el tiempo de ser mi tutora temporal. Además le agradezco las enseñanzas, consejos y asesorías fundamentales para realizar a cabo el trabajo de laboratorio exitosamente. Muchas gracias Andrea.

Agradezco al Parque Nacional Lagunas de Chacahua y a la directora Biól. Edda Carolina González del Castillo, por su apoyo y facilidades para trabajar dentro de las lagunas de Chacahua.

Agradezco también a la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín y a la UNAM por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Zoología en el Instituto de Biología donde realicé la extracción y amplificación de material genético.

Agradezco a la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdemar y al laboratorio de Biología Molecular y de la Salud por llevar a cabo la genotipificación de las muestras de cocodrilos..

También agradezco a mi jurado revisor, conformado por Dr. Oscar Flores Villela, Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Pierre Charruau, Dr. José Flores Martínez y el Dr. Marco Suárez Atilano, por leer, revisar y aportar con sus valiosas observaciones a la tesis.

Agradezco al Dr. Marco Alejandro Suarez Atilano por sus asesorías, comentarios y recomendaciones en el análisis de datos, quien me ofreció su ayuda de la manera más generosa posible, muchas gracias.

Agradezco a Alejandro Domínguez y Vladimir Salinas quienes me brindaron su ayuda en la colecta y traslados en las lagunas de Chacahua. Quiero decirles que fueron parte indispensable en este trabajo, estoy muy agradecido por brindarme su ayudarme y por ser las grades personas que son. Agradezco su amistad, alojo y alimentarme en Chacahua aun siendo un desconocido. De corazón muchas gracias.

Agradezco a mis padres Ma. del Pilar Ortiz Camacho y Gil Soria Benítez por seguir apoyándome para lograr mis metas y objetivos personales.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVO	8
2.1 Objetivos particulares.....	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. ANTECEDENTES	10
5. MATERIAL Y MÉTODO	14
5.1 Área de estudio.....	14
5.2 Colecta de datos.....	15
5.3 Trabajo de laboratorio.....	15
5.4 Análisis de datos.....	16
6. RESULTADOS	19
6.1 Reconocimiento de individuos parentales e híbridos.....	20
6.2 Hibridación genética.....	21
6.3 Introgresión genética.....	24
6.4 Diversidad genética.....	25
7. DISCUSIÓN	28
7.1 Origen de hibridación.....	28
7.2 Hibridación e introgresión.....	29
7.3 Diversidad genética.....	31
7.4 Desplazamiento de la especie nativa.....	32
7.5 Implicaciones en la conservación.....	33
8. CONCLUSIÓN	36
BIBIOGRAFÍA	37
ANEXO	43

RESUMEN

Una de las consecuencias de la translocación deliberada de especies no nativas es la hibridación entre especies filogenéticamente cercanas, poniendo en peligro a las poblaciones nativas. En cocodrilos es muy común el traslado de individuos de especies a lugares donde éstas no habitan, especialmente a unidades de manejo donde no siempre se tienen las características adecuadas para contener de manera segura a individuos en cautiverio. Durante los años 1970s se introdujeron al cocodrilario del Parque Nacional Lagunas de Chacahua ubicada en la costa del Pacífico cocodrilos supuestamente de la especie *Crocodylus moreletii* provenientes del golfo de México. Poco tiempo después, estos cocodrilos lograron escapar a las lagunas anexas y comenzaron a entrecruzarse con la especie local *Crocodylus acutus*.

Este trabajo pretende evaluar los niveles de hibridación e introgresión genética de *Crocodylus moreletii* en la especie nativa *Crocodylus acutus* y conocer el estado genético de la población de cocodrilos en Lagunas de Chacahua. Para esto se tomaron muestras y datos merísticos de 80 cocodrilos de Chacahua y Río Verde. Se amplificaron nueve microsatelites que se compararon con datos de 139 cocodrilos del Golfo de México. Se realizaron análisis de asignación genética usando STRUCURE, de hibridación con INTROGRESS, de introgresión genética con NewHybrids y análisis de diversidad genética.

Morfológicamente se lograron identificar 25 cocodrilos con evidencia de hibridación; sin embargo, genéticamente se identificaron de 36 (escenario 2) a 47 (escenario 1), sugiriendo que la mitad de la población de cocodrilos de Chacahua está conformada por la especie nativa *C. acutus* pura. Se identificó que los cocodrilos introducidos en Chacahua probablemente provenían de la región de la península de Yucatán, que aparentemente ya tenían ancestría híbrida y no eran *C. moreletii* puros como se pensaba. Se encontró que la mayoría de los híbridos tenían ancestría mayoritaria de *C. acutus* en su genoma y que algunos cocodrilos ya han perdido por completo la identidad de la especie local. Afortunadamente la diversidad genética de la especie local *C. acutus* es muy alta (0.6100) comparado con otras poblaciones de *C. acutus*; sin embargo, se detectó mayor diversidad genética en la población híbrida dentro de las lagunas de Chacahua (0.6311, n = 80) y de 40 a 31 alelos más que la población nativa, lo cual puede ser muy perjudicial para la especie nativa. Finalmente, se encontraron ejemplares híbridos fuera de

Chacahua, lo cual es una seña inequívoca de que los cocodrilos invasores han comenzado a desplazarse a zonas aledañas poniendo en riesgo la integridad genética de las poblaciones cercanas de Chacahua. De esta manera es de vital importancia que se comiencen a tomar medidas de conservación para el rescate de la especie nativa *C. acutus* de Chacahua, así como de zonas aledañas, como puede ser una campaña de manejo y contención de híbridos.

ABSTRACT

Unnatural hybridization in populations in which humans have translocated individuals in distribution areas of another similar species have endangered native populations. In crocodiles, the transfer of individuals from species to places where they do not live is very common, especially to management units where the appropriate characteristics are not always available to securely hold individuals in captivity. During the 1970s, crocodiles supposedly of the species *Crocodylus moreletii* from the Gulf of Mexico were introduced into the Lagoons of Chacahua National Park located on the Pacific coast. Shortly thereafter, these crocodiles managed to escape to the adjacent lagoons and began to interbreed with the local species *Crocodylus acutus*.

This work aims to evaluate the levels of genetic hybridization and introgression of *Crocodylus moreletii* in the native species *Crocodylus acutus* and to know the genetic status of the population in Lagoons of Chacahua. For this, samples and meristic data were taken from 80 crocodiles of Chacahua and Río Verde. Nine microsatellites were amplified and compared with data from 139 crocodiles in the Gulf of Mexico. Genetic mapping analyzes were performed using STRUCTURE, hybridization with INTROGRESS, genetic introgression with NewHybrids and analysis of genetic diversity.

Morphologically, 25 crocodiles were identified with evidence of hybridization; however, genetically identified 47 hybrid crocodiles (scenario 1) to 36 hybrid crocodiles (scenario 2), suggesting that half of the population of Chacahua crocodiles is made up of the native species *C. acutus* pure. It was identified that the crocodiles introduced in Chacahua probably came from the region of the Yucatan peninsula, which apparently already had hybrid ancestry and were not *C. moreletii* pure as previously thought. It was found that most of the hybrids had majority ancestry of *C. acutus* in their genome and that some crocodiles have already completely lost the ancestry of the local species. Fortunately, the genetic diversity of the local species *C. acutus* is very high (0.6100) compared to other populations of *C. acutus*; however, greater genetic diversity was detected in the hybrid population within the Chacahua lagoons (0.6300) and 40 to 31 alleles more than the native population, which can be very harmful for the native species. Finally, hybrid specimens were found outside of Chacahua, which is an unequivocal sign that the invasive population

has begun to move to nearby areas, putting at risk the genetic integrity of nearby Chacahua populations. In this way it is vitally important that conservation measures be initiated for the rescue of the native species *C. acutus* from Chacahua, as well as surrounding areas, such as a campaign to extract as many hybrids as possible.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más grandes que enfrenta la conservación de la biodiversidad en la actualidad es la translocación de especies a regiones donde éstas no habitan. La translocación de ejemplares se puede llevar a cabo para el rescate genético de especies, conflictos antrópicos o para aprovechamiento humano (Huxel, 1999, Harrison y Larson, 2014). Sin embargo, esto ha traído como consecuencia que las probabilidades de invasión e hibridación con especies similares aumente considerablemente (Allendorf y Luikart, 2007; González-Trujillo *et al.*, 2012) poniendo en riesgo a poblaciones locales.

Si las condiciones ambientales son adecuadas para la especie exótica, éstas pueden esparcirse por la zona (Anderson, 1949; Huxel, 1999) y potencialmente volverse en una especie invasora. Sin entrecruzamiento, la interacción entre las especies es competitiva en aspectos ecológicos (Bellini *et al.*, 1996; Huxel, 1999), amenazando el ecosistema y a las especies nativas por depredación o transmisión de enfermedades, e incluso pueden llegar a causar daños económicos (Pimentel *et al.*, 2001). Por otro lado, si las especies introducidas y nativas pueden hibridar esto aumentaría la coexistencia competitiva (Bellini *et al.*, 1996), el desplazamiento de las especies y potencialmente la extinción local de la especie nativa (Huxel, 1999). Eventualmente puede haber introgresión por retrocruzas provocando efectos negativos en la integridad genética de la especie nativa (Anderson, 1949; Huxel, 1999; Martinsen *et al.*, 2001; Baack y Reinseberg, 2007; Harrison y Larson, 2014; Meilink *et al.*, 2015).

La introgresión puede definirse como la incorporación de material genético por retrocruzas de una especie al genoma de otra especie (Anderson, 1949). La introgresión genera pérdida de integridad o independencia genética (también conocida como contaminación genética; Meilink *et al.*, 2015) y puede establecer nuevos genotipos favorecidos por la selección, haciendo que haya pérdida en el esfuerzo reproductivo de la especie nativa (Leary *et al.*, 1993; Martinsen *et al.*, 2001; Allendorf y Luikart, 2007; Muhlfeld *et al.*, 2009). Todo esto aumenta las probabilidades de que la especie nativa sea desplazada. Huxel (1999) menciona que el desplazamiento de una especie local por la no nativa o híbridos, puede ocurrir muy rápido, hasta en menos de cinco generaciones. La introgresión por lo tanto es un tema de gran interés para la conservación de especies locales (Martinsen *et al.*, 2001).

Los cocodrilos son un grupo con grandes problemas de conservación en el mundo. Existen 23 especies de cocodrilos reconocidas en el mundo (Oaks, 2011) y todas ellas están en alguna categoría de riesgo de la IUCN Red List. En México hay dos especies pertenecientes a la familia Crocodylidae, *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii*, y una especie de la familia Alligatoridae, *Caiman crocodilus chiapasius*. Todas ellas se encuentran protegidas por la NOM-059-SEMARMAT-2010. *Crocodylus acutus* se distribuye en toda la costa del Pacífico, desde Tamaulipas hasta Chiapas y en la península de Yucatán (Thorbjarnarson, 2010). Se caracteriza por ser de gran tamaño (entre 3 y 4 m) (Álvarez del Toro, 1974; Thorbjarnarson, 2010) y tener un hocico alargado y angosto. Tiene de dos a seis escudos postoccipitales y cuatro escudos nucales, sin escamas intercaladas en las escamas subcaudales. Su coloración en adultos es grisácea oscura y en juveniles gris con tonos verdes (Álvarez del Toro, 1974). Se asocia a cuerpos de agua salada o salobre, como aguas estuarinas, lagunas costeras, manglares y también en aguas dulce (Álvarez del Toro, 1974; Thorbjarnarson, 2010). *Crocodylus moreletii* se distribuye a lo largo de todo el golfo de México hasta Yucatán (Platt *et al.*, 2010). Es de menor tamaño (hasta 3.5 m) y tiene un hocico corto y redondeado en la punta, cuatro o más escudos postorbitales y seis escudos nucales, y puede presentar escamas intercaladas en las escamas subcaudales. La coloración en adultos es pardo oscuro y en los jóvenes regularmente es moteado de pardo y negro (Álvarez del Toro, 1974). Se asocia a cuerpos de agua dulces, como arroyos, pantanos, lagunas, ciénagas y ocasionalmente a cuerpos de agua salobres (Álvarez del Toro, 1974; Platt *et al.*, 2010).

Crocodylus acutus y *C. moreletii* no son especies hermanas; sin embargo, están cercanamente relacionadas (Oaks, 2011) y pueden hibridizar sin problema alguno. Ambas especies coinciden en la Península de Yucatán y se ha reportado hibridación de manera natural entre ellas (Cedeño-Velázquez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2009; Pacheco-Sierra-Sierra *et al.*, 2010, 2016). También se ha reportado hibridación por introducción de *C. acutus* en poblaciones de *C. moreletii* en las localidades de El Aguacate y Villa Flores de Chiapas, (Romero, 2015) así como en zonas aledañas a la zona de contacto natural como Veracruz (González-Trujillo *et al.*, 2014; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016). Más recientemente se ha reportado hibridismo de *C. moreletii* en zonas de *C. acutus* en la costa del océano Pacífico (Serrano-Gómez *et al.*, 2016; Pacheco-Sierra *et al.*,

2018). En Belice, Hekkala *et al.* (2015) reportaron hibridación de *C. acutus* con poblaciones de *C. moreletii*. En todos estos trabajos se identificaron híbridos y su desplazamiento en toda la península, en todo el estado de Veracruz llegando hasta Tamaulipas en el golfo de México, y en el Pacífico en Guerrero y Oaxaca especialmente por introducciones de *C. moreletii*. Un punto focal de hibridación de *C. moreletii* en poblaciones de *C. acutus* es en la población de Chacahua, Oaxaca (Serrano-Gómez *et al.*, 2016; Pacheco-Sierra *et al.*, 2018).

En el Parque Natural Lagunas de Chacahua (más adelante referido simplemente como Chacahua) existen poblaciones nativas del cocodrilo americano (*C. acutus*) (CONANP, 2014). En 1974 se introdujeron al cocodrilario de Chacahua ejemplares del cocodrilo del pantano (*C. moreletii*) para mantenerse en cautiverio. Según la CONANP (2014) estos cocodrilos provenían de Veracruz; sin embargo, Serrano-Gómez *et al.*, 2016 encontró que los haplotipos hallados de *C. moreletii* en Chacahua coincidían con ejemplares de Tabasco. Poco tiempo después de haberse introducido individuos al cocodrilario de Chacahua, se reportó el escape de individuos de *C. moreletii* hacia las lagunas de Chacahua que se cree, ha traído como consecuencia el entrecruzamiento con la especie nativa *C. acutus* (CONANP, 2014). Reportes hechos por los trabajadores de Chacahua basados en la morfología, indican que actualmente hay una gran proporción de ejemplares híbridos entre la especie nativa *C. acutus* y la especie introducida *C. moreletii*, y que éstos se han comenzado a desplazar a cuerpos de agua aledaños a las lagunas (i. e. ríos y manglares que conectan con las lagunas).

Este trabajo pretende evaluar los niveles de hibridación e introgresión genética de *C. moreletii* en la especie nativa *C. acutus* en las lagunas de Chacahua y determinar el grado de desplazamiento que ha sufrido *C. acutus* a causa de la hibridación. Además pretende conocer los efectos que genera la introgresión de una especie invasora en la variación genética de la población local nativa de Chacahua.

2. OBJETIVO

Evaluar los niveles de hibridación e introgresión genética que presenta la población nativa de *C. acutus* en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua por efecto de la introducción de *C. moreletii*.

2.1 Objetivos particulares

- Determinar el grado de hibridación genética en la población de cocodrilos en las lagunas de Chacahua.
- Determinar el grado de introgresión genética que presentan los híbridos en Chacahua.
- Precisar el origen de los cocodrilos introducidos a Chacahua.
- Determinar la proporción de cocodrilos puros de la especie nativa *C. acutus* que hoy en día alberga Chacahua.
- Determinar qué efectos hay en la diversidad genética de los cocodrilos híbridos y puros de Chacahua.

3. JUSTIFICACIÓN

La especie *Crocodylus acutus*, también conocida como lagarto real se encuentra protegida en México por la Norma Oficial Mexicana-059 (Semarnat, 2010). Esta especie fue cazada intensivamente para la industria peletera en los años 60s y 70s, hasta reducir el número de individuos de manera drástica (Casas y Guzmán, 1970; Álvarez del Toro, 1974). Hoy en día se encuentra bajo la categoría de protección especial (Pr) y se encuentra ampliamente distribuida por toda la costa del océano Pacífico en México.

Recientemente los trabajadores en las lagunas de Chacahua han detectado la presencia de formas raras dentro de la población nativa de cocodrilos en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua en la costa de Oaxaca. Ahora se sabe que la población de Chacahua tiene presencia de cocodrilos híbridos (Serrano-Gómez *et al.* 2016; Pacheco-Sierra *et al.*, 2018), por lo que se cree que la población de *C. acutus* está siendo seriamente afectada por la introducción de *Crocodylus moreletii* que se ha esparcido dentro de la laguna tras una fuga de *C. moreletii* del cocodrilario en la misma reserva.

Está claro que la presencia de híbridos en una población alejada de la zona de contacto natural entre *C. acutus* y *C. moreletii* debido a translocaciones, puede traer graves consecuencias a la especie nativa, compitiendo por zonas de anidación, competencia ecológica, pérdida de esfuerzo reproductivo, desplazamiento de la especie local y en últimas instancias la extinción de la especie local. Además, dado que los cocodrilos se distinguen por recorrer grandes distancias y que los híbridos pueden expandirse rápidamente, estos ponen en riesgo a las poblaciones que se encuentran más allá de Chacahua. De esta manera es de vital importancia conocer el verdadero estado actual del proceso de hibridación en las lagunas de Chacahua, saber si estas se han dispersado más allá de Chacahua y evaluar cual sería el manejo adecuado de los cocodrilos en la zona para posteriormente plantear un plan de manejo para recuperar la población local de *C. acutus* en Chacahua.

4. ANTECEDENTES

El primer antecedente para evaluar la hibridación entre las especies *C. acutus* y *C. moreletii* con marcadores moleculares se remonta al trabajo de Ray *et al.* (2004) quienes midieron la diversidad genética de *C. moreletii* en Belice. En 140 muestras de cocodrilos amplificaron 540 pb de ADN mitocondrial (tARN y CSB-1), encontrando cuatro haplotipos de *C. acutus* en varias poblaciones de *C. moreletii*. Observaron que los valores de F_{st} eran muy elevados ($F_{st} = 0.28$) cuando se incluían los haplotipos de estos cuatro cocodrilos, a diferencia de cuando eran excluidos del análisis ($F_{st} = 0.06$). La introgresión de los haplotipos de *C. acutus* en las poblaciones de *C. moreletii* sugirieron una evidencia de la existencia de posibles híbridos entre estas especies.

En Belice, 10 años más tarde, Hekkala *et al.* (2014), realizaron un muestreo por toda la costa de Belice y algunas islas cercanas, colectando muestras de 110 cocodrilos (54 *C. acutus* y 56 *C. moreletii*) en 29 localidades. Amplificaron tres regiones de DNA mitocondrial (12s, 16s y la región control) obteniendo 110 secuencias de 1374 pb así como 13 microsatélites nucleares (Cj119, C391, Cj104, Cj122, Cj127, Cj35, Cj101, Cj131, Cj16, Cj18, Cj10, CUC20, CUD78). Analizando el ADN mitocondrial identificaron 24 *C. moreletii* con haplotipos de *C. acutus*, mientras que con el análisis de microsatelites se identificaron a 27 cocodrilos híbridos (35 %). Se encontró también que los híbridos en su mayoría podrían ser segunda de generación de híbridos (F_2) con herencia materna de *C. acutus*, y retrocruzas entre híbridos y *C. moreletii* puros. Morfológicamente encontraron que las escamas subcaudales y el tamaño del cráneo en relación con la longitud del cuerpo son caracteres importantes en el reconocimiento de los cocodrilos híbridos. Por último reportan que la nidada de los híbridos tiene mayor rango de cantidad de huevos y estos presentan mayor masa que los huevos de las dos especies parentales (*C. acutus* y *C. moreletii*), y que los híbridos tienen preferencias ecológicas parecidas a los de *C. moreletii*.

En México, Cedeño-Vázquez *et al.* (2008), realizaron el primer trabajo para evaluar introgresión utilizando marcadores moleculares. Amplificaron 477 pb de tres regiones mitocondriales (tARN^{pro}-tARN^{phe}-Dloop) de 115 cocodrilos (51 *C. acutus* y 64 *C. moreletii*) a lo largo de la Península de Yucatán, incluyendo muestras de Veracruz y Tamaulipas. Encontraron que 16 cocodrilos presentaban evidencia de mezcla de genes (14%) con

haplotipos de *C. moreletii* en individuos *C. acutus* y viceversa, especulando que la zona de hibridación llegaba a la península de Yucatán donde terminaba la distribución natural de *C. acutus*. Se percataron que los entrecruzamientos entre estas dos especies pueden ser biparentales.

Un segundo trabajo en México lo realizaron Rodríguez *et al.* (2008), quienes trabajaron también en toda la península de Yucatán pero utilizaron marcadores codominantes microsatelitales. Al amplificar 10 microsatélites en 83 cocodrilos encontraron que el 38.5 % de la muestra (32 cocodrilos) presenta evidencia de admixia entre *C. moreletii* y *C. acutus*, y 51 cocodrilos no la presentaban (19 *C. acutus* y 32 *C. moreletii*). También encontraron que la mayoría de los cocodrilos mezclados eran individuos F₁ o F₂ y pocas retrocruzas hacia *C. moreletii*, proponiendo que los eventos hibridación pueden ser muy antiguos y que es de importancia poner énfasis en el estudio de poblaciones donde haya existido translocación de cocodrilos por acciones antropogénicas.

La comparación entre los trabajos de Cedeño-Vázquez *et al.* (2008) y de Rodríguez *et al.* (2008) reconoció que la detección de híbridos con marcadores nucleares coodominates, como lo son los microsatélites es mucho apropiado que utilizar ADN mitocondrial debido al tipo de herencia. Sin embargo, cuando las retrocruzas tienen muchas generaciones, la señal de hibridación detectada con marcadores coodominates se va perdiendo debido a las retrocruzas, así que la utilización de marcadores como los microsatélites son mas útiles cuando la hibridación es reciente.

Machkour M'rabet *et al.* (2009) amplificaron 77 loci ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) de 144 cocodrilos en la costa de Yucatán y Quintana Roo, e islas Chinchorro y Cozumel. Encontraron que el 50 % de los cocodrilos eran híbridos y se localizaban en la costa de Yucatán y Quintana Roo, mientras que, los cocodrilos de las islas Cozumel y Chinchorro eran las únicas poblaciones de *C. acutus* puras en esa zona.

Gonzales-Trujillo *et al.* (2012) ampliaron la zona de estudio de hibridación en México, muestreando la zona sur de la costa de Veracruz. Obtuvieron muestras de 43 cocodrilos de las que se amplificaron cuatro genes mitocondriales (tARN^{Thr}-tARN^{Pro}-tARN^{Phe}-Dloop) y 9 loci microsatélites (C391, Cj16, Cj18, Cj20, Cj109, Cj119, Cj131,

Cu5123, Cuj131) para una submuestra de 24 cocodrilos. Dado que éstas poblaciones se encontraban cerca de unidades de manejo ambiental (UMA), donde normalmente se trasladan cocodrilos de otros estados, se esperaba encontrar híbridos en las poblaciones silvestres. En esta ocasión no se encontró evidencia de haplotipos de *C. acutus* en las poblaciones de *C. moreletii*; sin embargo, no necesariamente se descarta la hibridación en la zona y propone hacer mas estudios de cocodrilos en vida libre en Veracruz y Tamaulipas.

Dadas las propuestas anteriores, Pacheco-Sierra *et al.* (2016), realizó un muestreo de cocodrilos a lo largo de toda la vertiente del Golfo de México, incluyendo una localidad en Chiapas y otra en Oaxaca, abarcando toda distribución de *C. moreletii* en México. Amplificó 12 microsatélites para 300 cocodrilos en 65 localidades, incluyendo además el análisis de caracteres morfológicos para la identificación de híbridos. Sorpresivamente encontraron que las únicas poblaciones puras de *C. moreletii* se encuentran en San Luis Potosí y en Tabasco y que la zona híbrida se expande más allá de la zona de contacto natural en la península de Yucatán a prácticamente todo el Golfo de México hasta Tamaulipas. Incluso encontró evidencia de hibridación en Chiapas y Oaxaca. Se encontró una clina geográfica a lo largo de la zona de hibridación, donde la contribución de *C. acutus* es mayor al sur de la distribución y va disminuyendo hacia el norte y proponen que en la península de Yucatán la hibridación es un evento muy antiguo. Por último encontraron que los caracteres morfológicos más importantes para el reconocimiento de híbridos son la escama simple o doble en la cola y medidas entre la longitud total y longitud hocico cloaca respecto al tamaño del cráneo; sin embargo, también es evidente que los híbridos pueden presentar una gama muy amplia de combinación de caracteres.

Más recientemente Pacheco-Sierra *et al.* (2018) ampliaron su muestreo a toda la costa del Océano Pacífico en México, desde Nayarit hasta Chiapas. Con una muestra total de 374 cocodrilos de 92 localidades (incluyendo lo usados en su artículo de 2016) analizaron 12 microsatélites y 1,730 pb de ADN mitocondrial (cyt b, tARN^{Pro}-tARN^{Phe}-d-loop) para 271 muestras, así como 12,879 SNP's obtenidos por GBS (Genotyping by Sequencing) para 172 muestras. Con microsatélites encontraron cinco grupos genéticos, dos grupos en el Pacífico (*C. acutus*), un grupo en las islas del Caribe (*C. acutus*), un grupo al norte del Golfo de México (*C. moreletii*) y un último grupo de híbridos en el Golfo de

México. Con SNP's también encontraron cinco grupos genéticos, de los cuales tres de ellos fueron altamente congruentes con los inferidos a partir de microsatélites: Golfo de México norte (*C. moreletii*), islas del Caribe (*C. acutus*), híbridos del Golfo de México, un cuarto grupo se constituye en toda la costa del Pacífico (*C. acutus*) y un quinto grupo híbrido en la península de Yucatán, diferente de los híbridos del Golfo de México. En ambos análisis se observa en las costas de Oaxaca y Guerrero puntos de hibridación. Combinando información mitocondrial y nuclear encontraron un patrón de ancestría similar en que se distinguen *C. moreletii* puros cercanos a los híbridos del golfo, *C. acutus* de las islas del Caribe y del Pacífico y un grupo bien separado en la península de Yucatán. Proponen además cinco entidades evolutivas en todo México concordantes con la estructura encontrada con SNP's y ADN mitocondrial, dos ellas siendo híbridos como entidades evolutivamente significativas. Por último mencionan que la hibridación entre estas dos especies corresponde un evento muy antiguo que comenzó en la península de Yucatán aproximadamente hace 2.5 millones de años y que se expandió hacia el Golfo de México, y que la hibridación a fungido como un posible mecanismo de especiación.

Serrano-Gómez *et al.* (2016) realizaron un trabajo en las costas de Oaxaca y Guerrero, en el cual se incluyen muestras de los cocodrilos del Parque Natural Lagunas de Chacahua (Chacahua). Capturando un total de 73 cocodrilos de 6 localidades (26 de ellos provenientes de Chacahua) se amplificaron 556 pb de ADN mitocondrial (región control) para todas las muestras. Sorpresivamente en la localidad de Chacahua, donde de manera natural existe *C. acutus*, se encontraron cuatro haplotipos de *C. moreletii* en 15 cocodrilos. Los restantes 58 cocodrilos fueron identificados como *C. acutus*. Tal como Ray *et al.* (2004) en Belice, encontraron poca diversidad en los cocodrilos de *C. acutus* y los cocodrilos con haplotipos de *C. moreletii* (posibles híbridos) presentaban mayor diversidad genética. Dado la asignación de individuos híbridos se piensa que los cocodrilos *C. moreletii* introducidos al Chacahua provenían de Tabasco.

5. MATERIAL Y METODO

5.1 Área de estudio. Chacahua se ubica en la porción central de la costa sur del estado de Oaxaca en la Región Hidrológica RH-21 en colindancia con la Región Hidrológica RH-20 Costa Chica-Río Verde. El sistema lagunar incluye el complejo Chacahua-Pastoría y cuatro lagunas menores interconectadas por canales angostos: Salina Grande, Poza del Mulato, Poza de los Corraleños y Palizada (García-Grajales y Buenrostro, 2013a) y varias pozas de menor tamaño que se encuentran interconectadas por canales de manglares. Los ríos Verde, San Francisco y Chacalapa son escurrimientos de agua dulce que llegan a las lagunas de Chacahua (CONANP, 2014), siendo probables cuerpos de agua donde se puedan desplazar los cocodrilos de Chacahua. La presencia del río Verde le atribuye al Chacahua características de transición por el flujo de agua cuando se desborda naturalmente en época de lluvias y los escurrimientos que de él se derivan (García-Grajales y Buenrostro, 2013a). Gracias a esto hay una interconexión temporal entre los flujos de agua dulce y la vegetación alterando los ecosistemas y procesos ecológicos en área (Pérez-Delgado, 2002) (Figura 1).

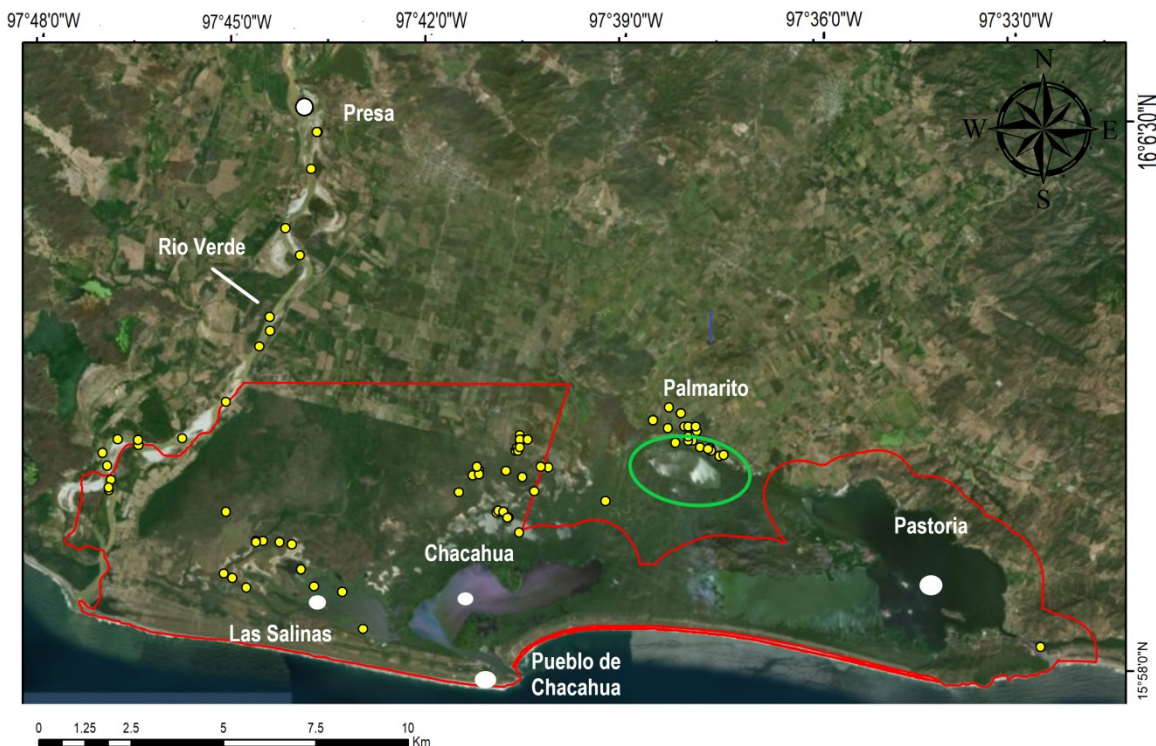


Figura 1. Mapa de capturas de 80 cocodrilos en Chacahua. En rojo la línea limite del Parque Nacional Lagunas de Chacahua. En verde la laguna Palmarito. Los puntos amarillos representan la ubicación de las capturas de cocodrilos.

5.2 Colecta de datos. Se realizaron capturas de cocodrilos a lo largo de todo Chacahua, incluyendo las lagunas principales (laguna de Chacahua y Pastoría), lagunas menores (Palizada, Salinas, Agua dulce, Mulato, Cerro Hermoso, El Grueso, Poza del tigre, Cerro Bolita y Los Nanches) y canales que interconectan a todas ellas. También se realizaron capturas en el Río Verde aledaño al Chacahua y la laguna de Palmarito, desde el inicio de la presa hasta la desembocadura del río hacia el mar, en un recorrido aproximadamente de 10 km (Figura 1). Todas las salidas fueron nocturnas desde las 8:00 pm hasta las 4:00-5:00 am del día siguiente. Las capturas se llevaron a cabo sobre un lancha con motor fuera de borda con una tripulación de tres personas, utilizando lámparas de cabeza de 1000 lumens.

Los organismos menores a 100 cm de longitud total (LT) se capturaron a mano y a los mayores de 100 cm de LT se capturaron con un lazo en una pértiga. A todos los cocodrilos capturados se les tomaron medidas de LT, se marcaron haciendo un corte en la quilla de la cresta caudal (evitando recapturas) y se tomó la referencia geográfica de cada captura con un GPS Garmin® (GDS84). A cada cocodrilo se le realizó una revisión morfológica para intentar identificar a los cocodrilos híbridos de los cocodrilos puros bajo los criterios de identificación de híbridos según lo descrito por Hekkala *et al.* (2015) y Pacheco-Sierra *et al.* (2016): escama simple o doble en la cola y la irregularidad de escamas nucales, sin embargo, debido a que hay una amplia gama de combinaciones en las escamas nucales y postoccipitales tanto en *C. acutus* y *C. moreletii* (Sigler, 1997; Platt *et al.*, 2008; García-Grajales *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2011), se utilizó el reconocimiento de híbridos en Chacahua como: *C. acutus* morfológicamente con escamas irregulares subcaudales. Todas las fotos se ingresaron a la colección fotográfica de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR). Las muestras de escama fueron preservadas en viales de etanol al 96% para su traslado al laboratorio de la CNAR del Instituto de Biología en la UNAM. Posterior a la captura y toma de datos, los cocodrilos se liberaron inmediatamente.

5.3 Trabajo de laboratorio. Se realizó la extracción de ADN de las muestras de escama por el método de precipitación por sales (Aljanabi y Martínez, 1997) y por kit de extracción © Qiagen siguiendo el protocolo de extracción de la empresa. Se amplificaron nueve marcadores microsátélites: Cj16, Cj18, Cj20, Cj35, Cj119, Cj109, Cj127, Cj128 y Cu391 desarrollados por Fitzsimmons (2001) los cuales han sido utilizados ampliamente en análisis genéticos en diferentes especies del género *Crocodylus* y han sido útiles en análisis

de hibridación entre estas *C. acutus* y *C. moreletii* Rodríguez *et al.* (2008), Romero (2015), Hekkala *et al.* (2015) y Pacheco-Sierra *et al.* (2016; 2018). Los microsatélites se amplificaron mediante PCR utilizando una temperatura de ligamiento de 58 °C (Rodríguez *et al.*, 2008; Romero, 2015; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016), a excepción de Cj20 y Cj109, los cuales amplificaron a 59 °C y 62°C, respectivamente (ver detalles de extracción en el Cuadro 1 Anexo).

Para llevar a cabo análisis de hibridación, introgresión y de estimación de índice de hibridación se tomó información de nueve marcadores microsatelitales (Cj16, Cj18, Cj20, Cj35, Cj119, Cj109, Cj127, Cj128 y Cu391) genotipificados de 139 cocodrilos por Pacheco-Sierra *et al.* (2016; 2018). De estos, se reunieron 38 cocodrilos puros de *C. moreletii* ($qi > 0.95$), 19 de ellos pertenecientes a la localidad de Laguna de las Ilusiones en Tabasco y 19 pertenecientes a la zona de Veracruz, 79 cocodrilos híbridos ($qi > 0.95$) de los cuales 22 pertenecen a la península de Yucatán y 57 distribuidos por el Golfo de México desde Tabasco hasta Tamaulipas; y, 22 cocodrilos puros de la especie *C. acutus*. Cabe mencionar que los marcadores utilizados en este trabajo y en el de Pacheco-Sierra *et al.* (2016) son los mismos. Todos los datos se recuperaron de la base de datos de Pacheco-Sierra *et al.* (2016) consultadas en datadryad (<http://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.3780c>).

5.4 Análisis de datos. Para la identificación de posibles híbridos y cocodrilos puros (individuos parentales), se utilizó el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) bajo un modelo de mezcla y frecuencias alélicas no correlacionadas (Rodríguez *et al.*, 2008; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016). Dado que se pretende identificar individuos genéticamente mezclados (híbridos) y cocodrilos puros (*C. acutus*) en Chacahua se corrió un análisis solamente con los 80 cocodrilos capturados en Chacahua, con un número máximo de grupos genéticos fijo de $K = 2$ y $K = 3$, esperando que los individuos con probabilidad de asignación mezclada sean cocodrilos híbridos. El programa se corrió a 1,000,000 de generaciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), 500,000 de generaciones de calentamiento (burnin) y 10 repeticiones de cada K probada.

Para resolver la confusión sobre la procedencia de los ejemplares de *C. moreletii* en Chacahua, ya que en el Programa de Manejo Parque Nacional Lagunas de Chacahua (CONANP, 2014) se menciona que los cocodrilos provenían de Veracruz y Serrano-Gómez

et al. (2016), que provenían de Tabasco, se realizó un segundo ensayo utilizando a los 80 cocodrilos capturados en Chacahua junto a 18 cocodrilos puros de la especie *C. moreletii* (9 de ellos pertenecientes a Tabasco y 9 a Veracruz). En este segundo análisis se probó un número fijo de grupos genéticos fijo de $K = 1$ hasta $K = 3$ con 1,000,000 generaciones MCMC, 500,000 generaciones de calentamiento y 10 repeticiones de cada K a probar.

Debido a que se identificaron ocho cocodrilos en Chacahua indefinidos genéticamente ya que no se agruparon a ninguna de las posibles especies parentales *C. acutus* o *C. moreletii*, se decidió correr más pruebas utilizando el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) para encontrar el origen genético de estos ocho cocodrilos. Se realizó una prueba utilizando los ocho cocodrilos de Chacahua y 79 cocodrilos híbridos identificados por Pacheco-Sierra *et al.* (2016; 2018) (22 pertenecientes a la península de Yucatán y 57 al Golfo de México), probando una K de 1 a 3 con 1,000,000 de generaciones de MCMC, 500,000 generaciones de calentamiento y 10 repeticiones de cada K probada. Por último, para corroborar la asignación de los ocho cocodrilos de Chacahua a la posible población de origen, se realizó una última prueba utilizando los ocho cocodrilos de Chacahua indefinidos genéticamente junto a 134 cocodrilos: 33 *C. moreletii* puros; 57 híbridos Golfo de México; 22 híbridos de la península de Yucatán; 22 *C. acutus* puros del Pacífico, probando una K de 1 hasta 4 con 1,000,000 de generaciones de MCMC, 500,000 generaciones de calentamiento y 10 repeticiones de cada K probada.

Se estimó el índice de hibridación (h) (Buerkle, 2005) utilizando el programa GenoDive (Meirmans y Van Tienderen, 2004). Los ejemplares puros (no mezclados) de *C. acutus* identificados previamente por el análisis STRUCTURE ($K = 2$, 35 *C. acutus* y $K = 3$, 46 *C. acutus*) fueron tomados en cuenta como dos posibles poblaciones parentales 1. Se consideraron tres posibles poblaciones parentales 2: 1) ocho cocodrilos genéticamente indefinidos de Chacahua, 2) ocho cocodrilos identificados en el análisis de asignación (Yucatán), y por último, 3) una mezcla de ambas poblaciones; es decir, los ocho cocodrilos de Chacahua junto con la población de cocodrilos a donde fueron asignados (8 cocodrilos de Yucatán).

De esta manera se corrieron seis pruebas diferentes utilizando 35 cocodrilos *C. acutus* puros (prueba de estructura de 80 muestras de Chacahua, $K = 2$) y 46 cocodrilos *C. acutus* puros (prueba de estructura con 98 muestras de Chacahua y *C. moreletii*, $K = 3$), por

cada población alterna mencionada previamente (Cuadro 4). Valores de $h = 0$ a 0.05 corresponderán a individuos no mezclados de la población parental dos y $h = 1$ a 0.95 corresponderán a individuos no mezclados de la población parental uno (*C. acutus*). Posteriormente bajo intervalos de confianza de 0.06 - 0.94 se designaron a todos los individuos híbridos en las lagunas de Chacahua.

Para calcular la probabilidad posterior de que un individuo pertenezca a una categoría híbrida o pura (Rodríguez *et al.*, 2008; Hekkala *et al.* 2015; Pacheco *et al.*, 2016), se utilizó el programa de NewHybrids (Anderson y Thompson, 2002). Para esta prueba solamente se utilizaron los 80 cocodrilos de Chacahua. Los cocodrilos se asignaron a las siguientes categorías: no mezclados (*C. acutus* y *C. moreletii*), híbridos (F1 y F2), o retrocruzas (híbrido x *C. acutus* e híbrido x *C. moreletii*), con el fin de conocer el nivel de introgresión genética que existe en la población de Chacahua. El análisis se corrió con 1,000,000 generaciones de MCMC y 1,00,000 generaciones de calentamiento.

Finalmente se estimaron estadísticos de diversidad genética, número de alelos (n_o), número promedio de alelos (A_p), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e), índice de Fijación (F), además se calculó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con la paquetería Adegnet y pegas del programa R. Este análisis se realizó tomando en cuenta el total de muestras (80 cocodrilos de Chacahua), tomando en cuenta a los cocodrilos que resultaron ser no mezclados en la población de Chacahua; es decir, a los cocodrilos identificados como *C. acutus* (especie nativa) y tomando en cuenta solamente a los de híbridos detectados en Chacahua.

6. RESULTADOS

Se capturaron en total 80 cocodrilos, 43 de ellos al interior de Chacahua, 18 en Río Verde y 19 en Palmarito, aledaños a Chacahua (Figura 1). Se lograron capturar cocodrilos de todas las categorías de tamaño: ocho neonatos (< 60 cm LT), 53 juveniles ($60.1 < TL < 120.0$ cm), 16 subadultos ($120.1 < TL < 180.0$ cm) y cuatro adultos (> 180.1 cm TL), según la categorización de García-Grajales *et al.* (2012) (Figura 2). Considerando los caracteres morfológicos empleados por Hekkala *et al.* (2015) y Pacheco-Sierra-Sierra *et al.* (2016) para la identificación de híbridos entre *C. acutus* x *C. moreletii*, se capturaron 25 individuos que podrían identificarse como híbridos (31%), 56 cocodrilos no presentaron evidencia de hibridación, identificados como *C. acutus* (69%). Cabe señalar que ninguno de los cocodrilos capturados en campo presentaban características morfológicas de *C. moreletii* (Figura 2).

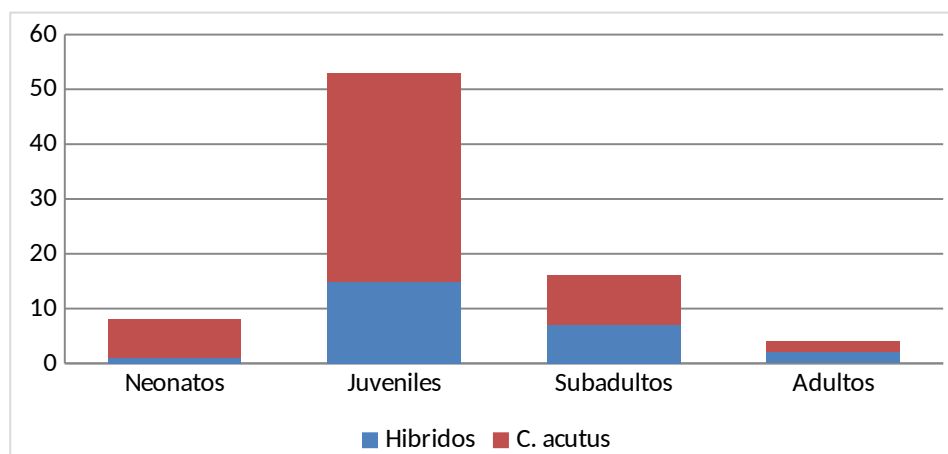


Figura 2. Número de cocodrilos híbridos y cocodrilos puros (*C. acutus*) identificados morfológicamente capturados por categoría de tamaño en Chacahua.

Solo en Chacahua 24 cocodrilos fueron identificados como *C. acutus* (55%) y 20 cocodrilos como híbridos (45%); en Río Verde 15 cocodrilos fueron identificados como *C. acutus* (83.33%) y tres cocodrilos como híbridos (16.66%); mientras que en Palmarito 13 cocodrilos fueron identificados como *C. acutus* (68%) y seis cocodrilos como híbridos (32%). Debido a que las localidades de Río Verde y Palmarito están muy próximas a Chacahua y en este trabajo se estima la hibridación de toda la muestra, a partir de ahora al

mencionarse a los cocodrilos de Chacahua se hará referencia a los 80 cocodrilos muestreados. Solo cuando sea necesario especificare si me refiero a una localidad u otra.

6.1 Reconocimiento de individuos parentales e híbridos. Con la el método de agrupación bayesiana (STRUCTURE, $K = 2$) considerando solamente a los 80 cocodrilos colectados en Chacahua, se encontró evidencia de 35 cocodrilos no mezclados asignados a la especie nativa *C. acutus* ($q_i > 0.95$, parental uno). A partir de ahora cuando se mencione análisis de estructura $K = 2$, se hará referencia al resultado que incluye 35 cocodrilos *C. acutus* puros. Se identificaron 37 individuos con probabilidad de asignación mezclada y ocho cocodrilos pertenecientes a un segundo grupo genético indefinido ($q_i > 0.95$, parental dos) (Figura 3a). Incluyendo en el análisis a 18 cocodrilos puros de la especie *C. moreletii* procedentes de Veracruz y Tabasco se lograron identificar a 46 cocodrilos nativos (*C. acutus*, $q_i > 0.95$, parental uno) A partir de ahora cuando se mencione análisis de estructura $K = 3$, se hará referencia al resultado que incluye 46 cocodrilos *C. acutus* puros, 26 individuos con probabilidad de asignación mezclada, un grupo genético de 18 *C. moreletii* puros perteneciente a Veracruz y Tabasco ($q_i > 0.95$) y ocho cocodrilos de Chacahua pertenecientes a un grupo genético indefinido ($q_i > 0.95$, parental dos) (Figura 3b).

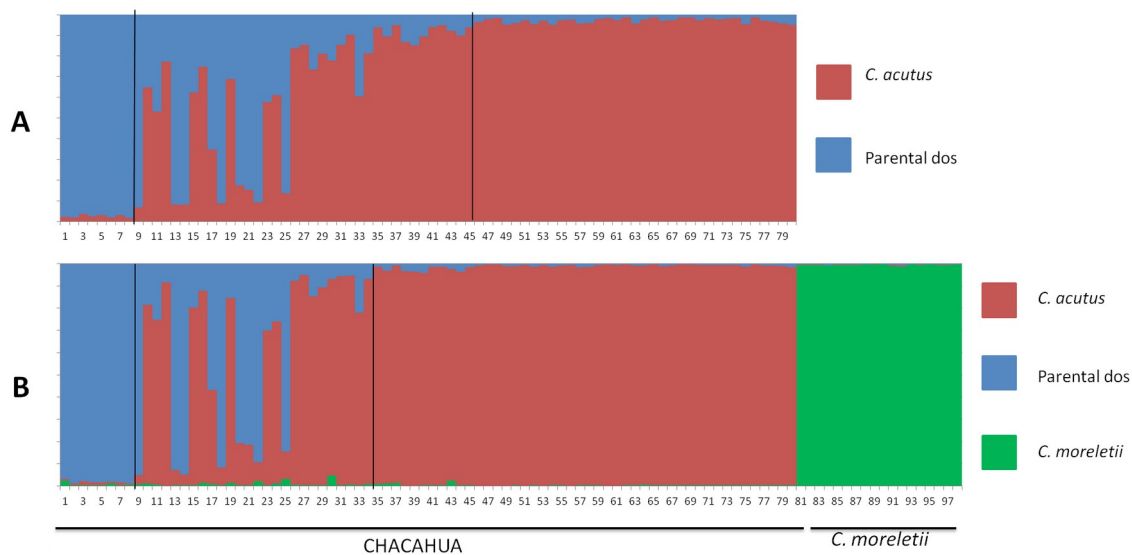


Figura 3. a) Asignación bayesiana utilizando el software STRUCTURE de 80 cocodrilos de Chacahua $K=2$. B) y $K=3$ que incluye 18 muestras de *C. moreletii* de Veracruz y Tabasco. Las líneas en negro dividen a los grupos genéticos encontrados.

Al comparar los ocho cocodrilos genéticamente indefinidos de Chacahua con los cocodrilos híbridos identificados por Pacheco-Sierra *et al.* (2016; 2018) de la península de

Yucatán y del Golfo de México, y las especies puras de *C. acutus* y *C. moreletii*, se determinó que los ocho cocodrilos Chacahua se agrupan con el grupo conformado por híbridos de Yucatán (Figura 4 A, B).

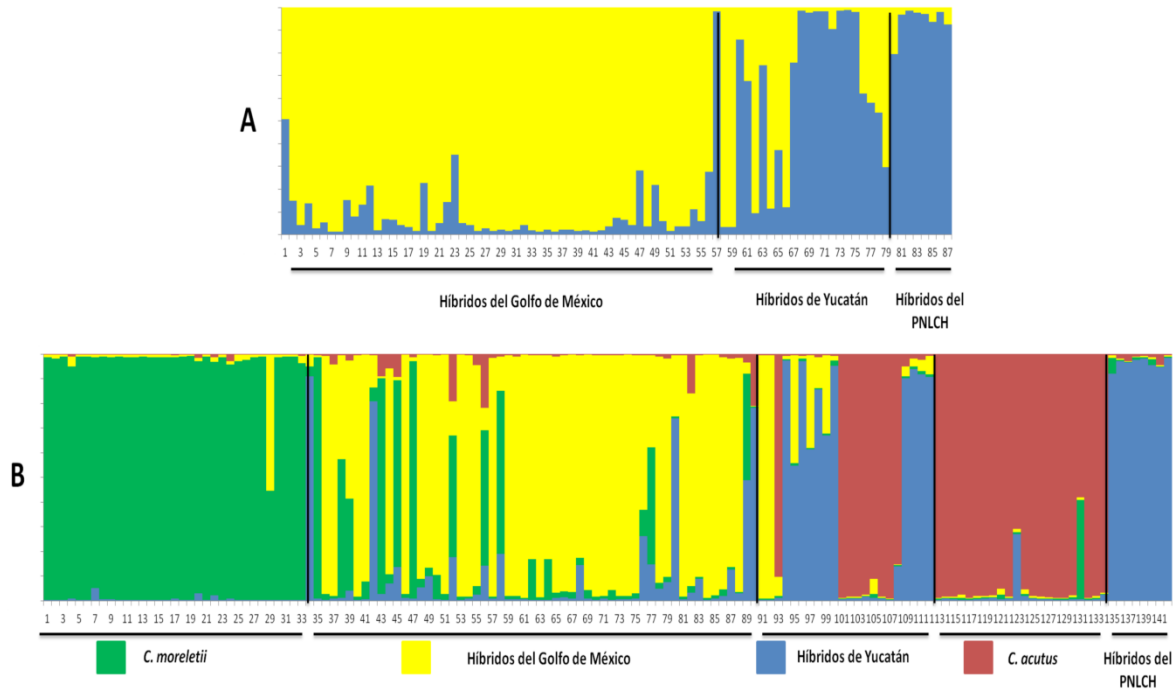


Figura 4. A) Asignación bayesiana utilizando el programa STRUCTURE (K = 2) de 87 cocodrilos, en amarillo se muestran los híbridos del Golfo de México y en azul los híbridos de Yucatán y de Chacahua. B) Asignación bayesiana utilizando el programa STRUCTURE (K = 4) de 142 cocodrilos.

6.2 Hibridación genética. El índice de hibridación (h) estimado, incluyendo a los ocho cocodrilos genéticamente indefinidos de Chacahua (grupo parental dos, Fig. 3) junto con los individuos parentales uno de la prueba de estructura K = 2 (35 cocodrilos puros de la especie *C. acutus*) recuperó nueve cocodrilos como *C. acutus* puros que previamente habían sido identificados con probabilidad de asignación mezclada (prueba bayesiana STRUCTURE K = 2). Seis de estos nueve cocodrilos ya habían sido previamente identificados como *C. acutus* por la prueba bayesiana STRUCTURE K = 3. Los tres cocodrilos restantes también fueron identificados como *C. acutus* puros por el índice de hibridación (h) estimado con los 46 *C. acutus* parentales uno de la prueba de estructura K = 3 (Cuadro 1). Se puede observar también que 19 y 14 cocodrilos (h de K = 2 y h de K = 3, respectivamente) identificados como híbridos, tienen una mayor proporción de alelos

compartidos con la especie *C. acutus* ($h > 0.6$, anaranjados); cinco y cuatro cocodrilos ($K = 2$ y $K = 3$, respectivamente) tienen una proporción de alelos compartidos cercanos al 50% de ambas especies parentales ($0.4 > h < 0.6$, amarillos); y se encontró que cuatro y tres cocodrilos ($K = 2$ y $K = 3$, respectivamente) están más cercanamente relacionados con el grupo parental dos ($h < 0.4$, azules) (Cuadro 1).

Cuadro1. Valores del índice de hibridación con dos poblaciones parentales de *C. acutus* seleccionados a partir del la probabilidad bayesiana. Las poblaciones parentales uno se componen de 35 cocodrilos puros de *C. acutus* ($K = 2$) o 46 cocodrilos puros de *C. acutus* ($K = 3$). La población parental dos se compone de ocho cocodrilos de Chacahua. En color rojo se señalan a *C. acutus*, en color anaranjado a cocodrilos con mayor número de alelos compartidos con *C. acutus*, en amarillo a cocodrilos con alelos compartidos cercanos a 50-50 y en azul a cocodrilos con menor porcentaje de alelos compartidos con *C. acutus*.

Índice de Hibridación inferido con 35 <i>C. acutus</i> parentales ($K = 2$)		Índice de Hibridación inferido con 46 <i>C. acutus</i> parentales ($K = 3$)	
ID	<i>h</i>	ID	<i>h</i>
CHH04	0.33	CHH04	0.324
CHH06	0.62	CHH06	0.772
CHH08	0.64	CHH08	0.81
CHH10	0.896	CHH10	0.946
CHH12	0.416	CHH12	0.559
CHH14	0.466	CHH14	0.472
CHH15	0.555	CHH15	0.969
CHH20	0.779	CHH20	0.797
CHH21	0.677	CHH21	0.686
CHH22	0.988		
CHH23	0.344	CHH23	0.422
CHH24	1		
CHH25	0.673	CHH25	0.808
CHH26	0.522	CHH26	0.69
CHH29	1		
CHH31	0.328	CHH31	0.333
CHH32	0.761		
CHH33	0.686		
CHH34	0.871		
CHH36	0.377	CHH36	0.389
CHH38	0.832		
CHH40	0.929		
CHH41	0.96		

CHH42	1	CHH42	1
CHH44	0.699	CHH44	0.73
CHH45	1		
CHH47	0.486	CHH47	0.57
CHH48	0.691	CHH48	0.711
CHH50	1		
CHH51	0.837	CHH51	0.859
CHH54	0.942	CHH54	1
CHH56	1	CHH56	1
CHH68	0.739	CHH68	0.787
CHH70	0.642	CHH70	0.645
CHH72	1	CHH72	1
CHH77	0.634	CHH77	0.676
CHH78	0.675	CHH78	0.69

El índice de hibridación (h) estimado con la población alternativa dos de Yucatán (ocho cocodrilos híbridos) y ambas poblaciones parentales uno de *C. acutus* (35 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* $K = 2$, y 46 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* $K = 3$), identificaron a los ocho cocodrilos genéticamente indefinidos de Chacahua como híbridos más cercanamente relacionados a *C. acutus* (Cuadro Anexo 1). La prueba con 35 cocodrilos *C. acutus* puros parentales $K = 2$ recuperaron a ocho cocodrilos como *C. acutus* puros, seis de los cuales también fueron recuperados con la prueba utilizando a 46 cocodrilos parentales *C. acutus* $K = 3$. Los restantes dos cocodrilos ya habían sido identificados previamente como *C. acutus* puros en la prueba de asignación bayesiana STRUCTURE $K = 3$. También se identificaron que 34 y 24 cocodrilos híbridos ($K = 2$ y $K = 3$, respectivamente) comparten una mayor proporción de alelos con *C. acutus* ($h > 0.6$, anaranjados); que pocos cocodrilos tienen una proporción de alelos compartidos cercanos al 50% ($0.4 > h < 0.6$ amarillos); y, que solo un cocodrilo en $K = 2$ y $K = 3$ está más cercanamente relacionado con el grupo parental dos de Yucatán ($h < 0.4$, azul) (Cuadro 2 Anexo).

Por último, la estimación del índice de hibridación (h) con el grupo parental dos conformado por ocho cocodrilos de Yucatán junto con ocho cocodrilos de Chacahua (16 cocodrilos híbridos) con ambas poblaciones parentales uno de *C. acutus* (35 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* $K = 2$ y 46 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* $K = 3$) se identificaron: a) seis cocodrilos como *C. acutus* puros (prueba con los cocodrilos paténtales

de estructura $K = 2$), de los cuales cuatro también fueron recuperados en la prueba con los cocodrilos parentales $K = 3$, los dos cocodrilos restantes ya habían sido identificados como *C. acutus* puros en la prueba $K = 3$; b) 21 y 14 cocodrilos identificados como híbridos ($K = 2$ y $K = 3$, respectivamente) están más cercanamente relacionados con *C. acutus* ($h > 0.6$, anaranjados); c) seis y siete cocodrilos con proporción de alelos compartidos cercanos al 50% de ambos parentales ($0.4 > h < 0.6$ amarillos); y, d) cuatro cocodrilos en la prueba con parentales uno de $K = 2$ más cercanamente relacionado con el grupo parental dos ($h < 0.4$, azul) (Cuadro anexo 2).

6.3 Introgresión genética. El análisis de probabilidad posterior bayesiana realizado con el programa NewHybrids, el cual estima la probabilidad de que un individuo pertenezca a una categoría híbrida o pura, indica que 39 cocodrilos en la muestra son *C. acutus* puros ($q_i > 0.95$), los cuales son prácticamente los mismos cocodrilos identificados por el análisis de estructura (STRUCTURE, $K = 2$ y $K = 3$) a excepción de cuatro cocodrilos. Un resultado importante de este análisis es que los ocho cocodrilos de Chacahua pertenecientes a un grupo genético indefinido se asignan como retrocruzas entre híbridos y el grupo parental dos (i.e. supuestamente *C. moreletii*). Este análisis permitió determinar que la mayoría de los cocodrilos híbridos en Chacahua son retrocruzas entre híbridos y la especie nativa *C. acutus*, además de que dos cocodrilos F2 tuvieron una alta probabilidad de asignación de cruce entre híbrido e híbrido ($q_i > 0.7$). Por último, se observó que prácticamente no hay cruces F1 entre *C. acutus* x parental dos (i.e. híbridos de Yucatán), ni tampoco se encontró evidencia de ejemplares puros de *C. moreletii* (Figura 5c, Cuadro 2).

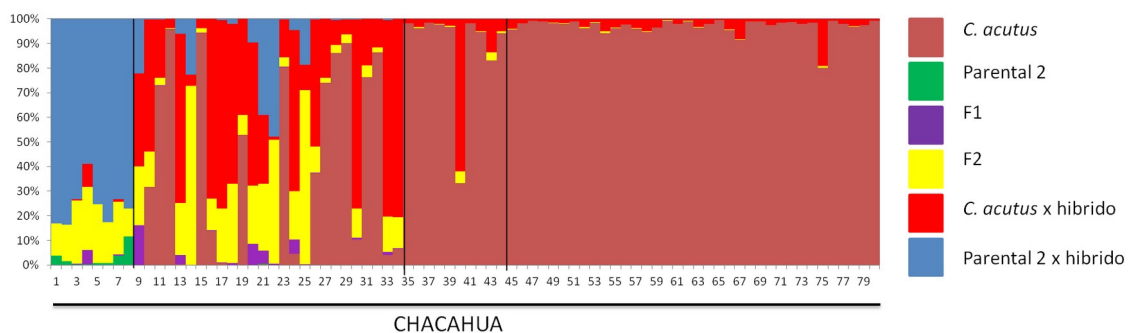


Figura 5. Probabilidad posterior de asignación bayesiana de diferentes clases híbridas utilizando el software NewHybrids de 80 cocodrilos de Chacahua. Líneas negras separan a la proporción de *C. acutus* puros, híbridos y un segundo grupo genético parental.

Cuadro 2. Asignación de 80 cocodrilos en Chacahua a las diferentes clases puras o híbridas utilizando 6 niveles confiabilidad.

Clase	Nivel de confianza					
	qi > 0.95	qi > 0.90	qi > 0.80	qi > 0.70	qi > 0.60	qi > 0.50
<i>C. acutus</i>	39	46	50	54	54	55
<i>C. moreletii</i>	-	-	-	-	-	-
F1	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	2	2	3
Híbrido x <i>C. acutus</i>	-	-	2	5	9	12
Híbrido x <i>C. moreletii</i>	-	-	3	7	8	8

6.4 Diversidad genética. Después de la identificación de cocodrilos puros de la especie *C. acutus* en Chacahua se estimaron los índices de diversidad para dos escenarios: a) el escenario estricto el cual contempla a los cocodrilos identificados por los tres análisis bayesianos (STRUCTURE; K = 2 y K = 3 y NEWHYBRIDS) en los que se recuperan 33 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* y 47 híbridos; y, b) el escenario laxo en el que se tomaron en cuenta a los cocodrilos que fueran asignados como *C. acutus* en al menos dos análisis bayesianos, con los que se recuperaron 44 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* y 36 cocodrilos híbridos (Cuadro 3). En general se observa una diversidad genética bastante alta para los dos escenarios planteados (> 0.6). La diversidad genética reportada para los 80 cocodrilos de Chacahua es la mayor comparada con lo reportado con los escenarios híbridos y que las muestras de *C. acutus* puros. No se encontró un exceso de heterocigos en la población de Chacahua ($F = 0.02572$). A diferente a los esperado se detectó un ligero exceso de heterocigos en los cocodrilos identificados como *C. acutus* puros: $F = -0.05374$ (escenario 1) y $F = -0.02025$ (escenario 2), mientras que las poblaciones híbridas de ambos escenarios presentaron un déficit de heterocigos (cuadro 3). Algo interesante que se observa es que los alelos que presentan las poblaciones puras de *C. acutus* en ambos escenarios son menos a los que presentan las poblaciones híbridas y cuando se analizan a los 80 cocodrilos de Chacahua (Cuadro 3). Por último, se observa que hay mas loci fuera de equilibrio de

HW cuando se analiza toda la población de Chacahua que cuando solo se analizan a los híbridos o a los cocodrilos *C. acutus* puros.

Cuadro 3. Diversidad genética de la población de Chacahua. Número de individuos (*n*), Heterocigosis observada (*Ho*), Heterocigosis esperada (*He*), número de alelos (*Na*), número promedio de alelos por locus (*Pa*) e Índice de fijación (*F*). Escenario 1 *C. acutus* (E1CA); Escenario 1 híbridos (E1HY); Escenario 2 *C. acutus* (E2CA); Escenario 2 híbridos (E2HY). En * los valores significativos para la prueba de Hardy-Weinberg.

Diversidad Genética						
POBLACIÓN	n	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Na</i>	<i>Pa</i>	<i>F</i>
Chacahua	80			89	9.8	0.02572
		0.6311	0.6477			
Escenario 1 <i>C. acutus</i>	33	0.6100	0.5788	49	5.4	-0.05374
Escenario 1 híbridos	47	0.6466	0.6655	79	8.7	0.02838
Escenario 2 <i>C. acutus</i>	44	0.6155	0.6033	58	6.4	-0.02025
Escenario 2 híbridos	36	0.6511	0.6566	75	8.3	0.00846

Prueba de Hardy-Weinberg					
Marcador	Cha	E1CA	E1HY	E2CA	E2HY
Cj16	0.029*	0.027*	0.408	0.006*	1
Cj18	0.002*	0.420	0.013*	0.234	0.066
Cj20	0.001*	0.041	0.010*	0.013*	0.025*
Cj35	0.000*	0.016*	0.050*	0.001	0.190
Cj109	0.000*	0.005*	0.309	0.015*	0.230
Cj119	0.271	0.812	0.530	0.356	0.722
Cj127	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
Cj128	0.036*	1	0.031*	0.343	0.135
Cu391	0.000*	0.142	0.000*	0.015*	0.000*

Cuadro 4. Cuadro resumen de resultados de análisis de probabilidad bayesiana STRUCTURE: K = 2 y K = 3 y los seis análisis de hibridación genética (Índice de hibridación h) con dos poblaciones parentales uno *C. acutus* y 3 poblaciones parentales dos.

POBLACIONES PARENTALES DOS	PRUEBAS DE ESTRUCTURA	
	Prueba STRUCTURE K = 2 con 80 cocodrilos de Chacahua	Prueba STRUCTURE K = 3 con 80 cocodrilos de Chacahua + 19 <i>C. moreletii</i> puros
	35 <i>C. acutus</i> puros 37 cocodrilos con ancestría mezclada (híbridos) 8 cocodrilos genéticamente indefinidos	46 <i>C. acutus</i> puros 26 cocodrilos con ancestría mezclada (híbridos) 8 cocodrilos genéticamente indefinidos 19 <i>C. moreletii</i> puros
	POBLACIONES PARENTALES UNO	
35 cocodrilos <i>C. acutus</i>	46 cocodrilos <i>C. acutus</i>	
8 cocodrilos de Chacahua	Índice de hibridación (h) de 37 cocodrilos	Índice de hibridación (h) de 26 cocodrilos
9 cocodrilos <i>C. acutus</i> $h > 0.95$ 19 cocodrilos híbridos $h > 0.6$ 5 cocodrilos híbridos $0.4 > h < 0.6$ 4 cocodrilos híbridos $h < 0.4$	5 cocodrilos <i>C. acutus</i> puros 14 cocodrilos híbridos $h > 0.6$ 4 cocodrilos híbridos $0.4 > h < 0.6$ 3 cocodrilos híbridos $h < 0.4$	
8 cocodrilos híbridos de Yucatán	Índice de hibridación (h) de 45 cocodrilos	Índice de hibridación (h) de 34 cocodrilos
8 <i>C. acutus</i> puros $h > 0.95$ 34 cocodrilos híbridos $h > 0.6$ 2 cocodrilos híbridos $0.4 > h < 0.6$ 1 cocodrilos híbrido $h < 0.4$	8 <i>C. acutus</i> puros $h > 0.95$ 24 cocodrilos híbridos $h > 0.6$ 1 cocodrilos híbrido $0.4 > h < 0.6$ 1 cocodrilos híbrido $h < 0.4$	
16 cocodrilos incluyendo a Chacahua y Yucatán	Índice de hibridación (h) de 37 cocodrilos	Índice de hibridación (h) de 26 cocodrilos
6 <i>C. acutus</i> $h > 0.95$ 21 cocodrilos híbridos $h > 0.6$ 6 cocodrilos híbridos $0.4 > h < 0.6$ 4 cocodrilos híbridos $h < 0.4$	5 <i>C. acutus</i> $h > 0.95$ 14 cocodrilos híbridos $h > 0.6$ 7 cocodrilos híbridos $0.4 > h < 0.6$	

7. DISCUSIÓN

En este estudio fue posible evaluar ampliamente el proceso de hibridación que de manera reciente ha ocurrido en la costa del océano Pacífico Mexicano entre la especie nativa *C. acutus* y los cocodrilos introducidos a Chacahua (Serrano-Gómez *et al.*, 2016; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016; 2018) provenientes de varias regiones de la península de Yucatán, analizando una muestra de 80 cocodrilos de la localidad. Previamente se había trabajado en Chacahua, pero el esfuerzo de muestreo había sido limitado y fue difícil estimar un aproximado del niveles de hibridación real en Chacahua.

7.1 Origen de la translocación de cocodrilos. Se logró identificar *C. acutus* puros y cocodrilos híbridos en Chacahua; sin embargo, no se detectó la presencia genética de *C. moreletii* puro dentro de las lagunas, coincidente con la revisión morfológica que se realizó en campo. En el análisis bayesiano donde se incluyen muestras de *C. moreletii* puros de Veracruz y Tabasco ($K = 3$), los cuales eran posibles poblaciones de origen de introducción (CONANP, 2014; Serrano-Gómez *et al.*, 2016), no se logró identificar introgresión de *C. moreletii* en la población de cocodrilos de Chacahua. Inesperadamente se encontró un segundo grupo genético en Chacahua de ocho cocodrilos detectado por los tres análisis bayesianos (STRUCTURE $K = 2$ y $K = 3$, y NewHybrids) que no corresponde a ninguna de las dos especies reconocidas de cocodrilos en México: *C. acutus* y *C. moreletii*. Estos ocho cocodrilos previamente habían sido identificados morfológicamente como cocodrilos híbridos en campo y cuando se realizó la prueba de asignación con el programa STRUCTURE incluyendo a los híbridos del Golfo de México y de la península de Yucatán, estos ocho cocodrilos de Chacahua claramente se agrupan con el grupo híbrido de la península de Yucatán (Figura 2A, B).

Serrano-Gómez *et al.* (2016) encontraron haplotipos pertenecientes a *C. moreletii* en las lagunas de Chacahua provenientes de Tabasco; sin embargo, no necesariamente quiere decir que los cocodrilos introducido en Chacahua hayan sido cocodrilos puros de la especie *C. moreletii*, y el resultado de Serrano-Gómez *et al.* (2016) se podría explicar en términos de herencia materna que provee la información mitocondrial. En su caso no existe la historia biparental completa del origen de un genoma. Gracias al uso de marcadores nucleares y codominantes como los microsatélites, se logró identificar el origen del segundo grupo genético de Chacahua, correspondiente al grupo híbrido de la península

Yucatán. Este hallazgo propone que los cocodrilos híbridos de Chacahua corresponden a los genomas híbridos con mucha encestaría paterna de *C. acutus* y con contribución materna de *C. moreletii* encontrados en Yucatán y no a *C. moreletii* puros de Tabasco o Veracruz (CONANP, 2010, Serrano-Gómez et al., 2016). De esta manera podemos decir, que los resultados sugieren que muy probablemente nunca hubo introducción de *C. moreletii* puros (eg. provenientes de la región norte del Golfo de México) en Chacahua y que los individuos establecidos ya tenían origen híbrido que corresponde a la zona de la península de Yucatán.

7.2 Hibridación e introgresión. Fue posible detectar la proporción de cocodrilos nativos *C. acutus* puros que aun están presentes en Chacahua y el porcentaje de hibridación que hasta la actualidad existe en las lagunas. El hibridismo en Chacahua es real y confirma las sospechas mencionadas por la gente local y resultados preliminares anteriores (Serrano-Gómez et al. 2016; Pacheco-Sierra et al. 2018).

Podemos asegurar bajo un escenario estricto donde se consideraron 33 cocodrilos puros de la especie *C. acutus* en Chacahua (41%, $q_i > 0.95$, escenario 1); pero siendo un poco más flexibles, se pueden calcular hasta 44 cocodrilos puros en Chacahua (55 %, escenario 2). Sin embargo, debido a la falta de certeza por la incongruencia en los análisis bayesianos evaluados, no podremos asegurar que 11 de estos cocodrilos sean realmente *C. acutus*. Es probable que estos 11 cocodrilos sean híbridos crípticos (Cedeño-Vásquez et al., 2008); es decir, cocodrilos que morfológicamente no presentan evidencia morfológica de hibridismo y que solamente se puedan detectar genéticamente debido a que las diferencias entre individuos parentales e híbridos se han vuelto indistinguible (Allendorf et al., 2001). Se esperaba mayor proporción de cocodrilos nativos puros (*C. acutus*) debido al reciente inicio de hibridación en las lagunas (finales de los años 70s), sin embargo; esto sugiere que los híbridos tiene gran capacidad para encontrar pareja, reproducirse y dispersarse por la zona en poco tiempo. Otros trabajos con cocodrilos han demostrado que las zonas híbridas son más grandes de lo esperado (Rodríguez et al., 2008; Pacheco-Sierra et al., 2016) y que incluso los ejemplares híbridos tienen a tener mayor éxito reproductivo que los especies parentales locales (Hekkala et al., 2015), lo cual representa un claro problema para la población nativa de Chacahua, ya que si no se atiende rápidamente, podría existir un declive mayor de la población local.

Nos dimos cuenta que la identificación morfológica no es suficiente para determinar el porcentaje de hibridación real en Chacahua, ya que en campo se identificaron 25 cocodrilos con caracteres de híbridos y con los análisis genéticos se identificaron de 47 a 36 (escenario 1 y escenario 2, respectivamente). Esto es esperado debido a que los cocodrilos que se introdujeron en Chacahua provenían de una zona híbrida antigua (Yucatán) que ya presentaban ancestría mayoritaria de *C. acutus* (Rodríguez *et al.*, 2008; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016, 2018), y debido a que gran parte de los híbridos identificados genéticamente en Chacahua pertenecen a la categoría de retrocruza híbridos x *C. acutus*, se espera que los caracteres morfológicos cada vez se diluyen más (Cedeño-Vásquez *et al.*, 2008; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016) debido al grado de introgresión genética que puede haber en los individuos (Allendorf *et al.*, 2001; Hermansen *et al.* 2011; Meilink *et al.*, 2015). Esto hace que la detección morfológica de híbridos en Chacahua sea más difícil y muchos de ellos parezcan cocodrilos sin mezcla de la especie *C. acutus*.

Tanto el índice de hibridación (h) como el análisis de probabilidad posterior NewHybrids coinciden en que los híbridos identificados en Chacahua son más parecidos a la especie nativa ya que comparten más alélelos con *C. acutus* y además fueron detectados como retrocruzas de híbridos con la especie local ($q_i > 0.5$). Esto era de esperarse ya que se supone que previo a la introducción a de cocodrilos en Chacahua la población local era 100% pura; y posteriormente, cuando se introdujeron cocodrilos y se inició el proceso de hibridación en las lagunas, tenían más probabilidad de cruzarse con un cocodrilo nativo (*C. acutus*) por presentar mayor abundancia en las lagunas. Así lo reportan Muhlfield *et al.* (2009) en la especie *Oncorhynchus mykiss* por la introducción de la especie no nativa *Oncorhynchus clarkii lewisi*, o lo que encontró Meilink *et al.* (2015) en la especie *Triturus cristatus* por la introducción de la especie exótica *Triturus cornifex*.

Sin embargo, también se encontraron individuos con una proporción de alelos muy baja de *C. acutus* y detectados como retrocruzas entre híbridos y los cocodrilos introducidos. Esto se puede deber a que al aumentar la cantidad de híbridos en las lagunas a través de los años, los encuentros entre híbridos y los cocodrilos introducidos en Chacahua pudieron ser más frecuentes y así comenzar a entrecruzarse entre ellos, después de todo se ha reportado que las retrocruzas entre los cocodrilos pueden ser biparentales (Cedeño-Vásquez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Hekkala *et al.*, 2015; Pacheco-Sierra *et al.*,

2106; 2018). Esto sin duda es evidencia de que se está perdiendo esfuerzo de reproductivo de la especie nativa porque cierto porcentaje de apareamientos se está llevando a cabo con híbridos y no con cocodrilos nativos (*C. acutus*).

Es difícil comparar el número de cocodrilos híbridos encontrados solo en Chacahua, debido a que los trabajos que se han hecho con estas dos especies se han enfocado en muestrear una extensa área geográfica (Rodríguez *et al.*, 2008; Cedeño-Vesques *et al.*, 200; Hekkala *et al.*, 2015) siendo los trabajos de Pacheco-Sierra *et al.* (2016, 2018) quienes abarcaron toda la distribución de *C. moreletii* y *C. acutus* en México. Serrano-Gómez *et al.*, (2016), tiene una muestra de 26 cocodrilos de Chacahua pero los análisis con ADN mitocondrial solamente revela la presencia de haplotipos mitocondriales de *C. moreletii* en cocodrilos de Chacahua, sin dar una estimación de la proporción de hibridación. La cantidad de híbridos encontrada en Chacahua es considerable tomando en cuenta la cantidad de muestras analizadas. Debido a esto parece importante resaltar la importancia de complementar los análisis previos con trabajos extensos localmente, especialmente en poblaciones de importancia en la conservación de estas especies o en zonas donde haya existido translocación de cocodrilos del Golfo de México a las costas del Pacífico, como en la costa de Guerrero.

7.3 Diversidad genética. La diversidad genética encontrada en la población del *C. acutus* puros en ambos escenarios es bastante alta ($H_o = 0.6100$, $N_a = 49$, $n = 33$ y $H_o = 0.6155$, $N_a = 58$, $n = 44$, respectivamente), comparado con lo que se reporta para esta especie en otros trabajos. Weaver *et al.* (2008) reportan en Cuba una diversidad genética observada de 0.49 de una población en cautiverio, por otra parte, Rodríguez *et al.*, (2008) reportaron una diversidad genética observada de 0.51 en la península de Yucatán, mientras que Romero (2015) en Chiapas encontró una diversidad genética observada de 0.432; por último, Milián-García *et al.* (2015) en poblaciones silvestres de Cuba reportaron una diversidad observada de 0.44 en la población de Birima y 0.62 en la población de Zapata. De esta manera la diversidad genética reportada en Chacahua es el segundo valor más alto encontrada para esta especie, resaltando la importancia que tiene la población de *C. acutus* en las lagunas para la especie y promoviendo la importancia en los esfuerzos de conservación en Chacahua.

Se encontraron dos aspectos importantes en la diversidad genética de la especie local. Cuando se analiza toda la muestra de Chacahua (80 cocodrilos) incluyendo híbridos claramente se detecta un aumento en el número de alelos, 40 a 31 alelos más de lo que tendría la población nativa en ausencia de cocodrilos híbridos (cuadro 3), no así se releja en de la diversidad genética, la cual es apenas ligeramente mayor ($H_o = 0.6300$, Chacahua) a lo que se detectó en los dos escenarios de *C. acutus* puros ($H_o = 0.61$ y $H_o = 0.6155$, respectivamente). Una de las consecuencias esperadas por la hibridación es la heterosis; esto quiere decir que la población híbrida presenta una mayor diversidad genética debido a las cruces entre los parentales esperando una descendencia de heterocigos (principalmente en F1) y esta se va perdiendo generaciones después por las retrocruzas que se puedan dar (Allendorf y Luikart, 2007).

Este fenómeno se encontró en Chacahua, ya que los individuos híbridos presentan mayor diversidad genética que los cocodrilos nativos (Cuadro 2). Sin embargo, cabría hacer la pregunta ¿es este aumento útil en la diversidad de la población en Chacahua? Se ha reportado una relación entre heterocigosis y adecuación (Allendorf y Luikart, 2007), y Hekkala *et al.* (2015) reportaron en Belice que la nidada de los híbridos tiene mayor rango de cantidad de huevos y estos presentan mayor masa que los huevos de las dos especies parentales (*C. acutus* y *C. moreletii*), dándoles mayor probabilidad de adecuación que los neonatos de *C. acutus*. Por lo que el reclutamiento de híbridos en Chacahua puede ser mayor que de cocodrilos puros, atentando contra la población pura de Chacahua.

7.4 Desplazamiento de la especie nativa. A pesar de que el proceso de hibridación en Chacahua es muy reciente, en pocas generaciones híbridas que pudieron ocurrir desde lo 1970' ha tomado una gran fuerza. En 50 años casi la mitad de los cocodrilos en Chacahua está compuesta por híbridos. La contaminación genética es innegable de tal modo que incluso se han detectado cocodrilos que prácticamente han perdido por completo la identidad del genoma local (Cuadro 4). Esto sin duda es una señal de que es posible un desplazamiento de la especie nativa en los años por venir (Huxel, 1999; Currat *et al.*, 2008; Meilink *et al.*, 2015) dado el reemplazamiento encontrado.

En este trabajo se registraron híbridos más allá de los límites del Parque Nacional Lagunas de Chacahua; tres en Río Verde y de 10 a 16 híbridos en la laguna Palmarito de acuerdo a los escenarios 1 y 2 respetivamente, lo cual es evidencia de que los híbridos han

comenzado a movilizarse a zonas aledañas, poniendo también en riesgo la integridad genética de las poblaciones próximas a Chacahua. La tasa de desplazamiento de los híbridos puede ser variable, pero se sabe que las zonas híbridas pueden ser muy dinámicas en algunas décadas (Buggs, 2007; Gompert *et al.*, 2017), porque cuando los híbridos llegan a los límites de distribución de una población nativa estos tienen más probabilidades de reproducirse con ejemplares parentales nativos en los bordes y poco a poco colonizar nuevas áreas haciendo que una zona híbrida se expanda (Buggs, 2007; Gompert *et al.*, 2017). Se cree que los individuos híbridos pueden tener mayor ventaja que la especie nativa incluso ecológica, ya que pueden expresar alelos ventajosos de ambas especies, lo que origina que los híbridos puedan tolerar o estén mejor adaptados a la variación ambiental permitiéndoles colonizar una mayor gama de ambientes que puede ser diferentes a lo ocupado por las especies parentales (Allendorf y Luikart, 2007). De hecho ya se ha reportado que ejemplares híbridos se pueden encontrar en las zonas marginales donde habitan las especies parentales (Choler *et al.*, 2004).

En cocodrilos ya se ha reportado el movimiento de zonas híbridas en la costa de Veracruz y la península de Yucatán, lo cual ha traído como consecuencia el desplazamiento de las especies parentales *C. acutus* y *C. moreletii* por cocodrilos híbridos, quedando muy pocas poblaciones aisladas de las especies (Pacheco-Sierra *et al.*, 2016, 2018). Dado que se ha reportado que las retrocruzas entre individuos puros e híbridos pueden ser biparentales (Rodríguez *et al.*, 2008; Hekkala *et al.*, 2015; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016) y se sabe que los cocodrilos tienen gran capacidad de desplazamiento (Pacheco-Sierra *et al.*, 2016), esto hace que la zona híbrida de Chacahua tenga el potencial expandirse rápidamente en un futuro. No hay que olvidar que también hay evidencia de hibridación en Guerrero y otras zonas de Oaxaca (Pacheco-Sierra *et al.*, 2018). De existir, tienen el potencial de convertirse en zonas híbridas en expansión, que pondrían en mayor riesgo la identidad genética de la especie *C. acutus* distribuida a lo largo de la costa del océano Pacífico. Sin embargo, hace falta hacer una mejor evaluación al respecto.

7.5 Implicaciones en la conservación. El reconocimiento genético de híbridos en Chacahua apenas es el primer paso para realizar un manejo adecuado de la población silvestre de cocodrilos de Chacahua. Allendorf *et al.* (2001), propone dos tipos de manejo según la naturaleza de la hibridación, si esta es natural, o sea el resultado de factores

antropogénicos. De manera natural podríamos citar el caso del lobo rojo (*Canis rufus*) en los cuales se demostró que estos presentaban hibridación antigua con el coyote (*Canis latrans*). En este caso los lobos rojos deberían ser considerados una entidad evolutiva cuyo origen es híbrido por introgresión genética haciendo deseable su protección y conservación (Wilson *et al.*, 2000; VonHoldt *et al.*, 2016). Entre especies de crocodilianos se ha reportado hibridización natural entre *C. acutus* y *C. rombifer* (Milián-García *et al.*, 2015) y entre *C. acutus* y *C. moreletii* (Rodríguez *et al.*, 2008; Cedeño- Vesques *et al.*, 2008; Machkour M´rabet *et al.*, 2009; Hekkala *et al.*, 2015; Pacheco-Sierra *et al.*, 2016). Recientemente Pacheco-Sierra *et al.* (2018) encontraron que la hibridación entre *C. moreletii* y *C. acutus* existe desde hace 3-2.5 millones de años y que es un proceso importante en la evolución de estos linajes como posible fuerza de especiación, propiciando la formación de dos entidades evolutivamente independientes de origen híbrido y resaltando la importancia la conservación de los cocodrilos híbridos y de las especies parentales.

En casos donde la hibridación fue causada por efectos antropogénicos, la conservación debe priorizarse en la ayuda de las poblaciones nativas (Allendorf *et al.*, 2001). Allendorf *et al.* (2001) menciona que la única manera en la que los híbridos de este tipo deberían estar sujetos a protección es cuando los híbridos tienen la última reminiscencia de de información genética de ese taxón o cuando una población sufrió un cuello de botella dejándola con poca variación y es necesario aumentar su variación por medio del rescate genético (hibridación intencional y controlada). Un ejemplo muy claro ocurrió en la especie *Puma concolor coryi* de Florida donde se decidió introducir a la subespecies hermana *P. c. stanleyanapara* de Texas para salvarla de los efectos de la depresión por endogamia y aumentar su variación genética (Johnson *et al.*, 2010).

La hibridación en la zona de Chacahua fue consecuencia directa de translocaciones causadas por el humano, y se encontró un porcentaje de híbridos y cocodrilos nativos (*C. acutus*) de aproximadamente 50-50 %, lo cual indica que existe un "enjambre de híbridos" (Allendorf y Luikart, 2007). Afortunadamente aun queda un alto porcentaje de cocodrilos nativos en la zona lo cual merece comenzar un gran esfuerzo de conservación para la recuperación de la especie local. Los cocodrilos híbridos de Chacahua no tienen la última reminiscencia de información genética de *C. acutus*, por ejemplo, y aunque los híbridos

proveen una fuente de variación genética para la población local, es evidente que éstos más bien representan una fuerte amenaza para la población local y poblaciones aledañas de la especie nativa. A pesar de que la heterosis encontrada en Chacahua podría estar estrechamente relacionada a una mayor adecuación de los cocodrilos híbridos comparada a la de los ejemplares parentales, es imperante que se extraigan a los híbridos antes de que sea más difícil el manejo de estos dentro del parque y fuera de él.

8. CONCLUSIONES

De manera estricta se puede decir que el Parque Nacional Lagunas de Chacahua alberga una proporción mayor de cocodrilos híbridos que de cocodrilos puros de la especie local *C. acutus* ya que se encontraron 33 cocodrilos puros y 47 cocodrilos híbridos.

El origen de los cocodrilos introducidos en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua es de descendencia híbrida de la zona de la península de Yucatán y no de cocodrilos puros de la especie *C. moreletii* como se pensaba anteriormente.

La mayor parte de cocodrilos híbridos detectados presentan mayor ancestría de *C. acutus*, sin embargo también se han encontrado híbridos con mayor ancestría de los cocodrilos introducido en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua, lo cual quiere decir que se está perdiendo esfuerzo reproductivo de la población local.

Se encontró mayor diversidad genética en la población híbrida de cocodrilos en Chacahua, la cual puede traer como consecuencia mayor adecuación de estos que los cocodrilos puros de Chacahua, lo cual puede traer graves consecuencias a la población pura de *C. acutus*.

Se detectaron cocodrilos híbridos fuera del Parque Nacional Lagunas de Chacahua, indicio del posible desplazamiento de híbridos a cuerpos de agua aledaños, poniendo en riesgo a las poblaciones puras de *C. acutus* cercanos al Chacahua.

Es urgente comenzar a tomar medida de manejo para conservación de la especie local en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua y ya que se concluyó que los híbridos en esta zona representan un peligro para la especie local y zonas aledaños, se recomienda que se realice una extracción de híbridos de Chacahua lo mas pronto posible.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aljanabi, S. M. y I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 22: 4692-4693.
- Álvarez del Toro, M. 1974. Los Crocodylia de México. Instituto Mexicano de Recursos naturales A. C., México D. F., 70 pp.
- Anderson, E. 1949. Introgressive hybridization. New York: Wiley, E. U. A. 108 pp.
- Anderson, E. C. y E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160: 1217-1229.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P. y J. K. Wenburg. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 613–622.
- Allendorf, E. C. y G. H. Luikart. 2007. *Conservations and the genetics of the populations*. Blackwell Publishing, E. U. A., 642 pp.
- Baack, J. E. y H. L. Rienseberg. 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics and Devepeloment*, 17: 513-518.
- Bellini, M., Mangioini, S. y R. Deza. 1996. Coexistencia competitiva en sistemas biológicos: analogía con un oscilador forzando con razonamiento. *Revista Mexicana de Física*, 43: 50-58.
- Buerkle, C. A. 2005. Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. *Molecular Ecology Notes*, 5: 684–687.
- Cedeño-Vázquez, J. R., Rodriguez, D., Calmé S., Ross, P. J., Densmore III, D y J. B. Thorbjarnarson. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatán Península: I. Evidence from mitochondrial DNA and morphology. *Journal of Experimental Zoology*, 309: 661-673.
- Choler, P., Erschbamer, B., Tribsch, A., Gielly, L. y P. Taberlet. 2004. Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: insights from alpine *Carex curvula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 171–176.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2014. Programa de Manejo Parque Nacional Lagunas de Chacahua. Editorial CONANP, México D. F. 213 pp.
- Currat, M., Moore, J. S., Siren, J. y J. Tang. 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution*, 62: 1908-1920.

- Demarchi, D. A. 2009. Microsatelites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11: 73-88.
- Dever, A. J. y D. L. Densmore III. 2001. Microsatellites in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) and Their Utility in Addressing Crocodylian Population Genetics Questions. *Journal of Herpetology*, 35: 541-544.
- García-Grajales, J., Buenrostro-Silva, A. y P. R. Téllez-Rodríguez. 2009. Variación del patrón de escutelación nugal del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus* Cuvier 1807) en la Ventanilla, Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 25: 375-382.
- García-Grajales, J., Buenrostro-Silva, A. y P. Charruau. 2012. Growth and age of juvenile American crocodiles (*Crocodylus acutus*) in the Ventanilla estuary, Oaxaca, México. *Herpetological conservation and biology*, 7: 330-338.
- García-Grajales, J. y S. A. Buenrostro. 2013. El Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca: Perspectivas a sus 75 años. *CIENCIA ergo-sum*, 21: 149-153.
- Garrido, G. y E. Vázquez. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista mexicana de biodiversidad*, 94: 1031-1054.
- González-Trujillo R., Rodríguez D., González-Romero A. et al. (2012) Testing for hybridization and assessing genetic diversity in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) populations from central Veracruz. *Conservation Genetics*, 13: 1677-1683.
- Gompert, Z., Mandeville, E. G. y C. A. Buerkle. 2017. Analysis of population genomic data from hybrid zones. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 48: 207-29.
- Harrison, G. R. y L. E. Larson. 2014. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105: 795-809.
- Hekkala, E., Platt, S., Thorbjarnarson, J., Reunwater, T., Tessler, M., Cunningham, S., Twomey, C. y G. Amato. 2015. Integrating molecular, phenotypic and environmental data to elucidate patterns of crocodile hybridization in Belize. *Royal Society Open Science*, 2: 150409.
- Hermansen, J. S., Saether, S. A., Elgvin, T. O., Borge, T., Hjelle, E. y G. P. Saetre. 2011. Hybrid speciation in sparrows I: phenotypic intermediacy, genetic admixture and barriers to gene flow. *Molecular Ecology*, 20: 3812-3822.

- Huxel, R. G. 1999. Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*, 89: 143-152.
- Largiader, R. y A. Scholl. 1996. Genetic introgression between native and introduced brown trout *Salmo trutta* L. populations in the Rhone River Basin. *Molecular ecology*, 5, 417-426.
- Leary, R., Allendorf, F. y S. Forbes. 1993. Conservation genetics of bull trout in the Columbia and Klamath river drainages. *Conservation Biology*, 7: 856-865.
- Machkour-M'Rabet, S., Henaut, Y., Charruau, P., Gevrey, M., Winterton, P. y L. Legal. 2009. Between introgression events and fragmentation, islands are the last refuge for the American crocodile in Caribbean Mexico. *Marine Biology*, 156: 1321-1333.
- Marie, D., Bernatchez, L. y D. Garant. 2010. Loss of genetic integrity correlates with stocking intensity in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular ecology*. 19, 2025-2037.
- Martisen, G., Whirham, G., Turek, J. y P. Keim. 2001. Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, 55: 1325-1335.
- McDonald, D., Parchman, T., Bower, M., Hubert W. y F. Rahel. 2008. An introduced and a native vertebrate hybridize to form a genetic bridge to a second native species. *Ecology* 105, 10842-10845.
- Meilink, R., Arntzen, W., van Delft, J. y B. Wielstra. 2015. Genetic pollution of a threatened native crested newt species through hybridization with an invasive congener in the Netherlands. *Biological conservation*. 184, 145-153.
- Meirmans, P. G., y P. H. Van Tienderen. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*. 4: 792-794.
- Milián-García, Y., Ramos-Targarona, R., Pérez-Fleitas, E., Sosa-Rodríguez, G., Guerra-Manchena, L., Alonso-Tabet, M., Espinosa-López, G. y M. Russello. 2015. Genetic evidence of hybridization between the critically endangered Cuban crocodile and the American crocodile: implications for population history and *in situ/ex situ* conservation. *Heredity*. 114, 272-280.

- Muhlfeld, C. C., Kalinowski, S. T., McMahon, T. E., Sally, P., Leary, R. F. y F. W. Allendorf. 2009. Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. *Biology Letters*, 5: 328–331.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283-292.
- Oaks, J. R. 2011. A time calibrated species tree of Crocodylia reveals a recent radiation of the true crocodiles. *Evolution*, 65: 3285-3297.
- Pacheco-Sierra, G. 2010. Caracterización genética de *Crocodylus moreletii* en la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, Yucatán, México: Estructura genética poblacional y evidencia de hibridación entre *C. moreletii* y *C. acutus*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México. 70 pp.
- Pacheco-Sierra, G., Gampert, Z., Domínguez-Laso, J. y E. Vázquez. 2016. Genetic and morphological evidence of a geographically widespread hybrid zone between two crocodile species, *Crocodylus acutus* and *C. moreletii*. *Molecular Ecology*, 25: 3484–3498.
- Pacheco-Sierra, G., Vázquez-Domínguez, E., Pérez-Alquicira, J., Suárez-Atilano, M. y J. Domínguez-Laso. 2018. Ancestral Hybridization Yields Evolutionary Distinct Hybrids Lineages and Species Boundaries in Crocodiles, Posing Unique Conservation Conundrums. *Frontiers Ecology and Evolution*, 6:138.
- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O’Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino T., y Tsomondo T. 2001. Economic and enviromental threats of alien plant, animal and microbe invasions. *Agriculture, ecositems and environment*, 84: 1-20.
- Platt, S. G., Rainwater, T. R., Thorbjarnarson, J. B. S. T. McMurry. 2008. Scalation of morelet’s crocodile (*Crocodylus moreletii*) from northern Belize. *Herpetological Review*, 39: 293-296.
- Platt, S. G., Sigler, L. y T. R. Rainwater. 2010. Morelet’s Crocodile *Crocodylus moreletii*. Págs. 79 - 83 en (Manolis S. C. y C. Stevenson, eds.) *Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan*. Crocodile Specialist Group.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y P. Donnelly. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.

- Rodriguez, D., Cedeño-Vázquez, R. J., Forstner, J. R y D. Densmore III. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* y *Crocodylus moreletii* in the Yucatán Península: II. Evidence from microsatellites. *Journal of Experimental Zoology*, 309: 674-686.
- Romero, B. O. 2015. Variabilidad y estructura genética del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*) y del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en tres poblaciones de Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de estudios superiores Iztacala. UNAM. México D. F. 72 pp.
- Sánchez, V, M. 2007. Análisis de la variación genética de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F. 82 pp.
- Sánchez, H. O., López S. G., Naranjo O. A. y D. H. Benítez. 2011. Programa de monitoreo del cocodrilo del pantano (*Crocodylus moreletii*), México-Belice-Guatemala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 270 pp.
- Serrano-Gómez, S. S., Guevara-Chumacero, L. M., Barriga-Sosa, I. D. L. A., Ullóa Arvizu, R., González-Guzmán, S. y Vázquez-Peláez, R. 2016. Low levels of genetic diversity in *Crocodylus acutus* in Oaxaca and Guerrero, México, and molecular-morphological evidence of the presence of *C. moreletii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 69: 51–59.
- Sigler, L. 1997. Escutelación de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* en México. Cartel presentado en la: 4a Reunion del Grupo de Especialistas en Cocodrilianos de América Latina y el Caribe. U. J. A. T. Villahermosa, Tabasco, 1997.
- Thorbjarnarson, J. B. 2010. American Crocodile *Crocodylus acutus*. Págs. 46-53 en (Manolis S. C. y C. Stevenson, eds.) *Crocodyles status survey and conservation action plan*. Crocodile Specialist Group.
- Johnson, W. E., Onorato, D. P., Roelke, M. E., Land, E. D., Cunningham, M., Belden, R. C., McBride, R., Jansen, D., Lotz, M., Shindle, D., Howard, J., Wildt, D. E., Penfold, L. M., Hostetler, J. A., Oli, M. K. y S. J. O'Brien. 2010. Genetic restoration of the Florida panther. *Science*, 24: 329.

- Warren, E., Johnson, Onorato, D. P., Roelke, M. E., Land, E. D., Cunningham, M., . Belden, R. C., McBride, R., Jansen, D., Lotz, M., Shindle, D., Howard, J., Wildt, D. W., Penfold, L. M., Hostetler, J. A., Oli, M. K., y S. J. O'Brien. 2010. Genetic Restoration of the Florida Panther, *Science* 329, 1641.
- Weaver, J. P., Rodríguez, M. D., Venegas-Anaya, J. R., Cedeño-Vázquez, R. J., Forstner y L. D. Densmore III. 2008. Genetic characterization of captive Cuban Crocodiles (*Crocodylus rhombifer*) and evidence of hybridization with the American Crocodile (*Crocodylus acutus*). *Journal of Experimental Zoology*, 309A: 649-660.
- Wilson, P.J. et al. (2000) DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. *Can. J. Zool.* 78, 2156–2166.
- VonHoldt, B. M., Cahill, J. A., Fan, Z., Gronau, I., Robinson, J., Pollinger, J. P., Shapiro, B., Wall, J. y R. K. Kayne. 2016. Whole-genomes sequence analysis shows that two endemic species of North American wolf are admixtures of the coyote and gray wolf. *Science advances*, 2: e1401714.

ANEXO

Información suplementaria

Introgresión genética de *Crocodylus moreletii* en la especie nativa *Crocodylus acutus* en los sistemas acuáticos del Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca México

Gerardo Soria Ortiz y Víctor Hugo Reynoso Rosales

Cuadro 1 anexo. Condiciones de reacción de PCR de los nueve primer utilizados en este trabajo, fluorescencia, motivo de repetición y temperatura de amplificación utilizada para cada marcador.. Todos los PCRs se llevaron a cabo con un temperatura inicial de 94° C por 2 min, se guido de 35 ciclos de 94° C por un 30 segundos, temperatura de amplificación especifica y 72° C por 45 segundos, con una extensión final de 72°C por 5 min.

Primer	Secuencia 5'-3'	Fluorescencia	Motivo de repetición	Temperaturas de amplificación.
Cj16	CAT GCA GAT TGT TAT TCC TGA TG TGT CAT GOT GTC AAT TAA ACT C	FAM - F	(CA) ₂₀	58 °C
Cj18	ATCCAAATCCCATGA ACCTGAGAG CCG AGT OCT TAC AAG AGG CTG G	HEX - F	(CA) ₂₁	58 °C
Cj20	ACA ATG GGG ATC AGT GCA GAG GTT TCA AAT CCA CAG TCA TAT AGT CC	FAM - F		59 °C
Cj35	GTTTAGAAGTCTCCAA GCCTCTCAG CTG GGG CAA GGA TTT AAC TCT C	FAM - R	(CT) ₇ TA(C A) ₁₇ (CT) ₁₂	58 °C
Cj109	GTA TTG TCA ACC CCA CCG TGT C GTT TCC CCT CCA CAG ATT TAC TTG C	FAM - F		62 °C
Cj119	GTTTGCTGTGGAATGT TTCTAC CGC TAT ATG AAA CGG TGG CTG	HEX - R	(CA) ₁₄	58 °C
Cj127	CCC ATA GTT TCC TGT TAC CTG GTT TCC CTC TCT GAC TTC AGT GTT G	HEX - F	(CT) ₇ TT(CT) ₁₂ (CA) ₁₆	58 °C
Cj128	ATT GGG GCA GAT AAG TGG ACT C	HEX - F	(CA) ₂₂	58 °C

C391 GTT TCT TGC TTC TCT
TCC CTA CCT GG
ATG AGT CAG GTG FAM - F (CA)₂₂ 58 °C
GCA GGT TC
CAT AAA TAC ACT
TTT GAG CAG CAG

Cuadro 2 anexo. Índice de hibridación (*h*) estimado con dos poblaciones parentales de *C. acutus* seleccionados a partir de la probabilidad bayesiana STRUCTURE. Las poblaciones parentales uno se componen de 35 cocodrilos puros de *C. acutus* ($K = 2$) y 46 cocodrilos puros de *C. acutus* ($K = 3$). La población parental dos está compuesta por ocho cocodrilos híbridos de Yucatán ($q_i > 0.95$). En color rojo se señalan a *C. acutus*, en color anaranjado a cocodrilos con mayor número de alelos compartidos con *C. acutus*, en amarillo a cocodrilos con alelos compartidos cercanos a 50-50 y en azul a cocodrilos con menor porcentaje de alelos compartidos con *C. acutus*.

Índice de hibridación (<i>h</i>) de 45 cocodrilos, inferido con 35 <i>C. acutus</i> parentales ($K = 2$)					Índice de hibridación (<i>h</i>) de 34 cocodrilos, inferido con 46 <i>C. acutus</i> parentales ($K = 3$)					Resumen índice de hibridación (<i>h</i>).			
										$K = 2$		$K = 3$	
ID	<i>h</i>	ln(likelihood)	Low	Up	ID	<i>h</i>	ln(likelihood)	Low	Up	ID	<i>h</i>	ID	<i>h</i>
CHH01	0.728	-17.501	0.428	0.927	CHH01	0.764	-17.086	0.448	0.974	CHH01	0.728	CHH01	0.764
CHH04	0.764	-23.016	0.485	0.938	CHH04	0.791	-22.963	0.504	0.965	CHH04	0.764	CHH04	0.791
CHH06	0.879	-14.726	0.556	0.993	CHH06	0.916	-13.453	0.587	1.000*	CHH06	0.879	CHH06	0.916
CHH08	0.77	-22.504	0.413	0.976	CHH08	0.827	-26.159	0.489	0.988	CHH08	0.77	CHH08	0.827
CHH10	1	-23.04	0.847	1.000*	CHH10	1	-22.461	0.851	1.000*	CHH10	1	CHH10	1
CHH12	0.784	-15.5	0.431	0.976	CHH12	0.856	-21.35	0.541	1.000*	CHH12	0.784	CHH12	0.856
CHH13	0.35	-18.09	0.084	0.702	CHH13	0.376	-17.939	0.092	0.739	CHH13	0.35	CHH13	0.376
CHH14	0.669	-19.296	0.326	0.935	CHH14	0.707	-19.586	0.348	0.973	CHH14	0.669	CHH14	0.707
CHH15	0.968	-19.154	0.655	1.000*	CHH15	1	-23.475	0.775	1.000*	CHH15	0.968	CHH15	1
CHH16	0.596	-19.813	0.279	0.865	CHH16	0.635	-19.347	0.301	0.907	CHH16	0.596	CHH16	0.635
CHH17	0.868	-14.578	0.529	0.993	CHH17	0.945	-15.842	0.621	1.000*	CHH17	0.868	CHH17	0.945
CHH20	0.794	-13.741	0.431	0.983	CHH20	0.846	-13.237	0.464	1.000*	CHH20	0.794	CHH20	0.846
CHH21	0.71	-20.186	0.378	0.937	CHH21	0.744	-19.766	0.403	0.963	CHH21	0.71	CHH21	0.744
CHH22	0.652	-16.744	0.276	0.937	CHH22					CHH22	0.652		
CHH23	0.819	-20.669	0.51	0.98	CHH23	0.86	-22.646	0.567	1.000*	CHH23	0.819	CHH23	0.86
CHH24	0.685	-19.882	0.265	1.000*	CHH24					CHH24	0.685		
CHH25	1	-11.008	0.799	1.000*	CHH25	1	-14.053	0.82	1.000*	CHH25	1	CHH25	1
CHH26	0.783	-16.915	0.458	0.962	CHH26	0.872	-23.894	0.575	1.000*	CHH26	0.783	CHH26	0.872

CHH27	0.62	-16.375	0.306	0.875	CHH27	0.667	-16.014	0.334	0.931	CHH27	0.62	CHH27	0.667
CHH28	0.66	-23.909	0.363	0.889	CHH28	0.687	-24.777	0.379	0.924	CHH28	0.66	CHH28	0.687
CHH29	0.729	-31.217	0.439	0.931						CHH29	0.729		
CHH31	0.873	-16.888	0.543	0.993	CHH31	0.921	-16.589	0.584	1.000*	CHH31	0.873	CHH31	0.921
				1.000									
CHH32	0.92	-23.389	0.619	*						CHH32	0.92		
				1.000									
CHH33	0.736	-11.269	0.281	*						CHH33	0.736		
CHH34	0.818	-16.363	0.478	0.986						CHH34	0.818		
CHH35	0.62	-12.889	0.269	0.893	CHH35	0.636	-13.059	0.28	0.907	CHH35	0.62	CHH35	0.636
CHH36	0.788	-27.452	0.53	0.945	CHH36	0.83	-27.324	0.559	0.994	CHH36	0.788	CHH36	0.83
				1.000									
CHH38	0.948	-12.101	0.512	*						CHH38	0.948		
CHH39	0.62	-16.77	0.305	0.876	CHH39	0.663	-16.374	0.328	0.93	CHH39	0.62	CHH39	0.663
				1.000									
CHH40	0.837	-14.176	0.469	*						CHH40	0.837		
CHH41	0.91	-20.637	0.65	0.995						CHH41	0.91		
				1.000									
CHH42	1	-12.587	0.765	*	CHH42	1	-12.794	0.773	1.000*	CHH42	1	CHH42	1
CHH44	0.755	-13.685	0.385	0.974	CHH44	0.81	-13.631	0.418	1.000*	CHH44	0.755	CHH44	0.81
				1.000									
CHH45	1	-12.528	0.803	*						CHH45	1		
CHH47	0.541	-22.161	0.247	0.815	CHH47	0.577	-21.896	0.263	0.868	CHH47	0.541	CHH47	0.577
				1.000									
CHH48	1	-14.668	0.765	*	CHH48	1	-13.461	0.771	1.000*	CHH48	1	CHH48	1
				1.000									
CHH50	1	-15.262	0.813	*						CHH50	1		
				1.000									
CHH51	0.945	-11.09	0.641	*	CHH51	0.946	-15.634	0.67	1.000*	CHH51	0.945	CHH51	0.946
				1.000									
CHH54	1	-13.041	0.798	*	CHH54	1	-12.52	0.799	1.000*	CHH54	1	CHH54	1
				1.000									
CHH56	1	-12.085	0.788	*	CHH56	1	-11.964	0.791	1.000*	CHH56	1	CHH56	1
				1.000									
CHH68	0.802	-22	0.5	0.965	CHH68	0.888	-21.369	0.562	1.000*	CHH68	0.802	CHH68	0.888

CHH70	0.95	-20.821	0.672	1.000	*	CHH70	0.939	-21.006	0.663	1.000*	CHH70	0.95	CHH70	0.939
CHH72	0.808	-19.304	0.508	0.967		CHH72	0.808	-19.401	0.507	0.967	CHH72	0.808	CHH72	0.808
CHH77	0.982	-15.737	0.618	1.000	*	CHH77	1	-14.116	0.683	1.000*	CHH77	0.982	CHH77	1
CHH78	0.919	-17.241	0.678	0.996		CHH78	0.96	-17.172	0.706	1.000*	CHH78	0.919	CHH78	0.96

Cuadro 3 anexo. Índice de hibridación (*h*) estimado con dos poblaciones parentales de *C. acutus* seleccionados a partir de la probabilidad bayesiana STRUCTURE. Las poblaciones parentales uno se componen de 35 cocodrilos puros de *C. acutus* (K = 2) y 46 cocodrilos puros de *C. acutus* (K = 3). La población parental dos está compuesta por ocho cocodrilos híbridos de Yucatán ($q_i > 0.95$) y ocho cocodrilos de Chacahua (16 cocodrilos). En color rojo se señalan a *C. acutus*, en color anaranjado a cocodrilos con mayor número de alelos compartidos con *C. acutus*, en amarillo a cocodrilos con alelos compartidos cercanos a 50-50 y en azul a cocodrilos con menor porcentaje de alelos compartidos con *C. acutus*.

Índice de hibridación (<i>h</i>) de 37 cocodrilos, inferido con 35 <i>C. acutus</i> parentales (K = 2)					Índice de hibridación (<i>h</i>) de 26 cocodrilos, inferido con 46 <i>C. acutus</i> parentales (K = 3)					Resumen índice de hibridación (<i>h</i>).			
ID	<i>h</i>	ln(likelihood)	Low	Up	ID	<i>h</i>	ln(likelihood)	Low	Up	K = 2		K = 3	
ID	<i>h</i>	ln(likelihood)	Low	Up	ID	<i>h</i>	ln(likelihood)	Low	Up	ID	<i>h</i>	ID	<i>h</i>
CHH04	0.403	-21.835	*	0.775	CHH04	0.412	-21.948	*	0.789	CHH04	0.403	CHH04	0.412
CHH06	0.644	-19.341	0.174	0.935	CHH06	0.715	-18.521	0.248	0.969	CHH06	0.644	CHH06	0.715
CHH08	0.54	-21.682	0.033	0.926	CHH08	0.698	-25.988	0.239	0.973	CHH08	0.54	CHH08	0.698
CHH10	1	-23.04	0.703	1.000*	CHH10	1	-22.461	0.735	1.000*	CHH10	1	CHH10	1
CHH12	0.35	-24.366	0.05	0.712	CHH12	0.559	-22.616	0.143	0.896	CHH12	0.35	CHH12	0.559
CHH14	0.389	-29.499	0.117	0.718	CHH14	0.406	-29.969	0.122	0.741	CHH14	0.389	CHH14	0.406
CHH15	0.609	-28.74	0.179	0.909	CHH15	1	-23.475	0.618	1.000*	CHH15	0.609	CHH15	1
CHH20	0.724	-13.021	0.185	0.981	CHH20	0.783	-12.607	0.235	1.000*	CHH20	0.724	CHH20	0.783
CHH21	0.583	-19.501	0.079	0.915	CHH21	0.633	-19.159	0.118	0.941	CHH21	0.583	CHH21	0.633
CHH22	0.691	-18.319	0.246	0.961						CHH22	0.691		
CHH23	0.373	-25.088	*	0.782	CHH23	0.572	-23.728	0.074	0.903	CHH23	0.373	CHH23	0.572
CHH24	0.633	-20.574	0.077	1.000*						CHH24	0.633		
CHH25	0.749	-21.777	0.377	0.956	CHH25	0.873	-19.836	0.52	0.993	CHH25	0.749	CHH25	0.873
CHH26	0.602	-19.981	0.226	0.888	CHH26	0.79	-22.732	0.412	0.994	CHH26	0.602	CHH26	0.79
CHH29	0.733	-33.031	0.433	0.937						CHH29	0.733		
CHH31	0.527	-14.336	*	0.956	CHH31	0.555	-14.265	*	0.977	CHH31	0.527	CHH31	0.555

Cuadro 4 anexo. Identidad individual de 81 cocodrilos capturados en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua. Cada captura se designan a categoría hibrida o *C. acutus* puro con un criterio de 95% de confiabilidad en los análisis de asignación bayesiana STRSTRUCTURE. La asignación de NewHybrids se realizo con la probabilidad mas alta de pertenecer a cierta categoría, solo los valores en * están por arriba del 95% de confiabilidad de que pertenezca a esa categoría.

Ejemplar	Localidad	Cuerpo de agua	Longitud total (cm)	Clase de tamaño	Identificación morfológica	Identificación Structure K = 2 (<i>C. acutus</i> > 0.95)	Identificación Structure K = 3 (<i>C. acutus</i> > 0.95)	Identificación NewHybrids	NewHybrids Probabilidad asignación
1	Chacahua	Mulato	1640	Subadulto	Hibrido	Hibrido	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.82986
2	Chacahua	Mulato	735	Juvenil	<i>C. acutus</i>				

3	Chacahu a	Mulato	745	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99165 *
4	Chacahu a	Mulato	980	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	Hibrido indefinid o	0.37721
5	Chacahu a	Mulato	880	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99074 *
6	Chacahu a	Posa del Tigre	1890	Adulto	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.53746
7	Chacahu a	Las Salinas	873	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.98349 *
8	Chacahu a	Piedrit as	1760	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.72785
9	Chacahu a	Piedrit as	863	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.98084 *
10	Chacahu a	Piedrit as	110	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.95871 *
11	Chacahu a	Agua Dulce	2470	Adulto	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99022 *
12	Chacahu a	Chumb umbo	630	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.6893
13	Chacahu a	Palmar ito	900	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.83513
14	Chacahu a	Cerro Bolita	304	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	Hibrido F2	0.72731
15	Chacahu a	Garzas	2320	Adulto	Hibrido	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.94431
16	Chacahu a	Palmar ito	1840	Adulto	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.73264
17	Chacahu a	Palmar ito	1030	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.59048
18	Chacahu a	Palmar ito	870	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.96331 *
19	Chacahu a	Palmar ito	790	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.98575 *
20	Chacahu a	Palmar ito	860	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.72867
21	Chacahu a	Palmar ito	930	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.76489
22	Chacahu a	Palmar ito	740	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.64935
23	Chacahu a	Palmar ito	970	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.52974
24	Chacahu a	Palmar ito	750	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.58273
25	Chacahu a	Palmar ito	1060	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	Hibrido indefinid o	0.50456
26	Chacahu	Palmar	1180	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	Hibrido	0.50456

	a	ito						F2	
27	Chacahu a	Palmar ito	1020	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.75249
28	Chacahu a	Palmar ito	870	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.82615
29	Chacahu a	Palmar ito	690	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.80468
30	Chacahu a	Palmar ito	920	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.94293
31	Chacahu a	Palmar ito	1010	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.65533
32	Chacahu a	Palmar ito	725	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido F2	0.70728
33	Chacahu a	Palmar ito	994	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.5144
34	Chacahu a	Palmar ito	826	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.73951
35	Chacahu a	El Grueso	1500	Subad ulto	Hibrido	Hibrido	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.73325
36	Chacahu a	El Grueso	960	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.86063
37	Chacahu a	El Grueso	1492	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.96086 *
38	Chacahu a	El Grueso	1700	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.90109
39	Chacahu a	El Grueso	740	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Parental 2 x hibrido	0.76981
40	Chacahu a	El Grueso	640	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.76905
41	Chacahu a	El Grueso	595	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.76423
42	Chacahu a	El Grueso	720	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.86279
43	Chacahu a	El Grueso	556	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.80005
44	Chacahu a	El Grueso	637	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.80569
45	Chacahu a	El Grueso	745	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.98299 *
46	Chacahu a	El Grueso	967	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.9769*
47	Chacahu a	El Grueso	540	Neona to	Hibrido	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.96259 *
48	Chacahu a	Las Salinas	1100	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.9851*
49	Chacahu a	Las Salinas	1130	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.95951 *
50	Chacahu a	Las Salinas	1447	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.9774*

51	Chacahu a	Las Salinas	1222	Subad ulto	Hibrido	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.96799 *
52	Chacahu a	Las Salinas	1330	Subad ulto	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.94596
53	Chacahu a	Nanch es	1100	Juvenil	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.96359 *
54	Chacahu a	Nanch es	590	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i> x hibrido	0.6191
55	Chacahu a	Nanch es	1030	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99351 *
56	Chacahu a	Tamari ndos	1090	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.98271 *
57	Chacahu a	Las Salinas	1180	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.97921 *
58	Rio Verde	Rio verde	1260	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99102 *
59	Rio Verde	Rio verde	1040	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.96467 *
60	Rio Verde	Rio verde	1260	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.97986 *
61	Rio Verde	Rio verde	1290	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99581 *
62	Rio Verde	Rio verde	913	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.95419 *
63	Rio Verde	Rio verde	1000	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.91401
64	Rio Verde	Rio verde	660	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99047 *
65	Rio Verde	Rio verde	560	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99082 *
66	Rio Verde	Rio verde	780	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.97362 *
67	Rio Verde	Rio verde	1120	Juvenil	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.98516 *
68	Rio Verde	Rio verde	1605	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.94624
69	Rio Verde	Rio verde	1310	Subad ulto	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.98782 *
70	Rio Verde	Rio verde	580	Neona to	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.83001
71	Rio Verde	Rio verde	1240	Subad ulto	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.97858 *
72	Rio Verde	Rio verde	650	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.94254
73	Rio Verde	Rio verde	1390	Subad ulto	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.9847*
74	Rio Verde	Rio verde	600	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.79995
75	Rio Verde	Rio verde	635	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99323 *
76	Chacahu a	Cerro hermo so	1260	Subad ulto	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.97946 *

77	Chacahu a	Mulato	1140	Juvenil	<i>C. acutus</i>	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.95655 *
78	Chacahu a	Mulato	830	Juvenil	Hibrido	Hibrido	Hibrido	<i>C. acutus</i>	0.98272 *
79	Chacahu a	Mulato	880	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.96662 *
80	Chacahu a	Palizad a	1140	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.97398 *
81	Chacahu a	Palizad a	900	Juvenil	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	<i>C. acutus</i>	0.99246 *