

Tesis Doctoral

Estudios de la distribución de la variabilidad genética y análisis del sistema de apareamiento en poblaciones naturales de *Caiman latirostris* (Yacaré overo) (Reptilia, Alligatoridae)

Amavet, Patricia Susana

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Amavet, Patricia Susana. (2009). Estudios de la distribución de la variabilidad genética y análisis del sistema de apareamiento en poblaciones naturales de *Caiman latirostris* (Yacaré overo) (Reptilia, Alligatoridae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Amavet, Patricia Susana. "Estudios de la distribución de la variabilidad genética y análisis del sistema de apareamiento en poblaciones naturales de *Caiman latirostris* (Yacaré overo) (Reptilia, Alligatoridae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**ESTUDIOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA Y ANÁLISIS DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO EN
POBLACIONES NATURALES DE *Caiman latirostris* (YACARÉ
OVERO) (REPTILIA, ALLIGATORIDAE)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Patricia Susana Amavet

Director de tesis: Dra. Beatriz Saidman
Consejero de Estudios: Dra. Beatriz Saidman

Lugar de trabajo: Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral

Buenos Aires, 2009

ESTUDIOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y ANÁLISIS DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO EN POBLACIONES NATURALES DE *Caiman latirostris* (YACARÉ OVERO) (REPTILIA, ALLIGATORIDAE)

Resumen

Caiman latirostris (yacaré overo) es una de las dos especies de cocodrilianos citadas para nuestro país. Sus poblaciones silvestres son objeto de manejo en Argentina, mediante programas que utilizan el sistema de *ranching* (cosecha de huevos silvestres para cría en granjas), para su uso sustentable y la conservación de su hábitat. *C. latirostris*, en nuestro país, se encuentra en el Apéndice II de CITES, el cual permite el comercio regulado de su cuero y carne, y se ha convertido en una especie de gran importancia comercial, a nivel nacional e internacional.

Esta tesis incluye estudios genético-poblacionales del yacaré overo en la provincia de Santa Fe, Argentina. Se realizaron análisis de variabilidad, diferenciación y estructura genética empleando isoenzimas, marcadores RAPD y caracteres morfométricos, y un estudio de paternidad utilizando marcadores microsatélites. Los resultados obtenidos indican que las poblaciones analizadas de yacaré overo poseen valores de variabilidad genética de bajos a intermedios, diferenciación poblacional significativa y variabilidad fenotípica alta para algunos de los rasgos morfométricos estudiados. Además, se hallaron indicios de que el sistema de apareamiento de *C. latirostris* podría incluir el comportamiento de múltiple paternidad, al detectar más de un progenitor paterno en al menos una de las familias analizadas.

Palabras clave: *Caiman latirostris* - genética de poblaciones – variabilidad – isoenzimas – RAPD – microsatélites - morfometría – análisis de paternidad- sistema de apareamiento

**DISTRIBUTION STUDIES OF THE GENETIC VARIABILITY AND ANALYSIS OF
MATING SYSTEM IN WILD POPULATIONS OF *Caiman latirostris* (BROAD-
SNOUTED CAIMAN) (REPTILIA, ALLIGATORIDAE)**

Abstract

Caiman latirostris (broad-snouted caiman) is one of the two crocodylian species cited for Argentina. Their wild populations are subject to management in our country, by means of programs that use ranching system (harvest of wild eggs, captive rearing and reintroduction to wild) for their sustainable use and habitat conservation. In Argentina, *C. latirostris* is included in the Appendix II of CITES, therefore, the regulated trade of meat and leather is allowed, and this species has turned into an important resource at both national and international levels.

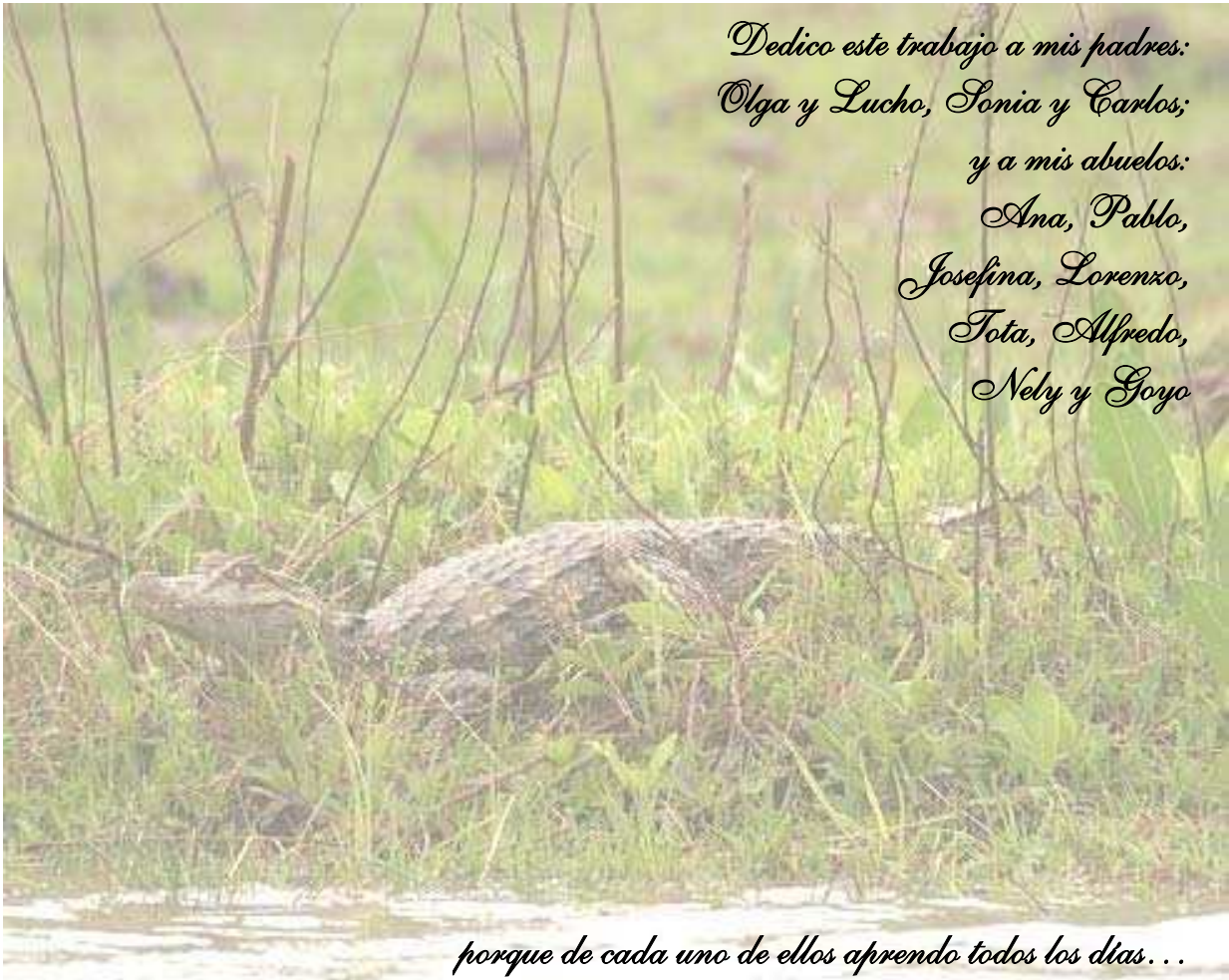
This thesis includes genetic population studies about broad-snouted caiman in Santa Fe province, Argentina. Analyses related to variability, differentiation and genetic structure were carried out through isozyme electrophoresis, RAPD markers, and quantitative traits. On the other hand, paternity studies were conducted using microsatellite markers. The obtained results indicate that analyzed broad-snouted caiman populations have low to intermediate genetic variability values, significant population differentiation, and high phenotypic variability for some of the studied morphometric traits. In addition, we found indications that *C. latirostris* mating system could include multiple paternity behavior, since we found more than one paternal progenitor in at least one of the analyzed families.

Key words: *Caiman latirostris* – population genetics – variability – isozymes – RAPD – microsatellite - morphometrics – paternity analysis – mating system

Agradecimientos

- *A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, y a todo el personal del Departamento de Ecología, Genética y Evolución, por admitirme a la carrera y acompañarme permanentemente en mi formación doctoral.*
- *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca de posgrado que posibilitó la realización de este trabajo de tesis doctoral. Además, por financiar un subsidio PIP que permitió la realización de la última etapa del presente estudio.*
- *A la Universidad Nacional del Litoral por el otorgamiento de subsidios dentro de los programas CAI+D 2002, 2005 y 2006, que posibilitaron el desarrollo de esta línea de investigación en la Facultad de Humanidades y Ciencias.*
- *A mi Directora de Doctorado y de Beca de CONICET, Dra. Beatriz Saidman por acompañarme permanentemente en este largo camino.*
- *A mi Codirector de Beca, Dr. Fabián Zalazar, por confiar en mí y colaborar en cada etapa de este trabajo.*
- *A mi Jefa de cátedra y amiga, Biól. Rosa Markariani por iniciarme en el camino de la investigación y por acompañarme en este desafío incansablemente.*
- *A mi “orientador”, compañero de trabajo y amigo, Bioq. Esteban Rosso porque sin su generosidad intelectual y humana este trabajo no hubiera sido posible.*
- *Al personal del Laboratorio FOMEC de la cátedra de Biología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por facilitarme el uso de equipamiento necesario para la ejecución de actividades de investigación.*
- *Al Dr. Juan César Vilardi por su generosa orientación en los análisis de datos, y por sus valiosos aportes y sugerencias en la ejecución de este trabajo.*
- *Al Dr. Carlos Piña, por la gestión de un proyecto PIP/CONICET que aportó con subsidios al desarrollo de este trabajo.*
- *A mi profesora primero, y amiga hoy y siempre, Dra. Liliana Rossi por contagiarme su espíritu por la investigación.*
- *Al Méd. Vet. Alejandro Larriera por darme la oportunidad de trabajar en este tema, y a todos los integrantes del Proyecto Yacaré por hacer de ese ámbito mi lugar de trabajo preferido.*

- *A mi amigo (casi hermano), Bioq. Pablo Siroski, y a mi amiga y compañera en esta compleja área de trabajo, Lic. Gisela Poletta, por la colaboración incondicional de ambos en procedimientos técnicos y metodológicos de variada índole durante todo este trabajo.*
- *A mi profesora, MsC Mercedes Marchese por impulsarme y decidirme a emprender este proyecto.*
- *Al Dr. Pablo Bolcatto por su colaboración técnica y sugerencias profesionales.*
- *A la Dra. Graciela Curi por confiar en mí sin condiciones.*
- *A mi compañera de trabajo, Dra. Eva Rueda, por constituirse en mi apoyo moral y laboral para la escritura de esta tesis.*
- *A mis amigas Vanina, Carina, Paula y Silvina, simplemente por ESTAR.*
- *A toda mi familia por ser, sencilla y maravillosamente eso: mi familia.*
- *A mis sobrinos: Pablo, Mateo y Julieta, por ser los tres soles de mi vida.*
- *A Marcelo por decidir ser mi compañero en la vida.*



*Dedico este trabajo a mis padres:
Olga y Lucho, Sonia y Carlos;
y a mis abuelos:
Ana, Pablo,
Josefina, Lorenzo,
Tota, Alfredo,
Nely y Goyo*

porque de cada uno de ellos aprendo todos los días...

Gracias por sus ejemplos de vida !!!

Índice

ACERCA DE LA ORGANIZACIÓN DE ESTA TESIS	1
ABREVIATURAS	2
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	4
1.1. Descripción de la especie	5
1.2. Situación poblacional y planes de manejo	10
1.3. Marcadores genéticos: descripción e importancia	16
1.3.1. Marcadores bioquímicos.....	17
1.3.2. Marcadores moleculares.....	18
1.3.2.1. RAPD.....	18
1.3.2.2. Microsatélites (SSR).....	19
1.4. Antecedentes	19
1.4.1. Análisis isoenzimáticos.....	20
1.4.2. Análisis de ADN.....	20
1.4.3. Estudios genéticos en yacaré overo en Argentina.....	21
1.4.4. Estudios morfométricos.....	22
1.5. Objetivos	23
1.5.1. Objetivos generales.....	23
1.5.2. Objetivos particulares.....	23
1.6. Bibliografía citada	24
CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA	33
2.1. Introducción	34
2.1.1. Análisis de variabilidad.....	34
2.1.2. Introducción al estudio de las isoenzimas.....	35
2.1.2.1. Nomenclatura.....	37
2.1.3. Introducción al estudio de los RAPD.....	39
2.1.4. Objetivos e Hipótesis.....	41
2.2. Materiales y Métodos	42
2.2.1. Estudios de isoenzimas.....	42
2.2.1.1. Obtención de muestras.....	42
2.2.1.2. Análisis de isoenzimas.....	43
2.2.2. Análisis de RAPD.....	45
2.2.2.1. Obtención de muestras.....	45
2.2.2.2. Aislamiento y purificación de ADN.....	46
2.2.2.3. Evaluación del polimorfismo (RAPD).....	47

2.2.2.3.1. Selección de los cebadores.....	47
2.2.2.3.2. Análisis de productos amplificados.....	48
2.2.3. Análisis de datos.....	50
2.2.3.1. Datos de isoenzimas.....	50
2.2.3.1.1. Índices de variabilidad genética utilizados.....	50
2.2.3.2. Datos de RAPD.....	52
2.2.3.2.1. Índices de variabilidad genética utilizados.....	53
2.2.3.2.2. Análisis de estructura poblacional.....	55
2.2.3.2.3. Cálculo de distancias genéticas.....	57
2.2.3.2.4. Análisis discriminante de correspondencia.....	59
2.3. Resultados.....	61
2.3.1. Isoenzimas.....	61
2.3.2. RAPD.....	63
2.3.2.1. Calidad del ADN obtenido.....	63
2.3.2.2. Análisis de variabilidad.....	63
2.3.2.3. Análisis de estructura poblacional.....	66
2.4. Conclusiones generales del capítulo.....	69
2.5. Bibliografía citada.....	70
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE VARIABILIDAD FENOTÍPICA.....	74
3.1. Introducción.....	75
3.1.1. Análisis de caracteres morfológicos.....	75
3.1.2. Aplicaciones de la morfometría.....	76
3.1.3. Estudios morfométricos en caimanes.....	77
3.1.4. Objetivos e Hipótesis.....	78
3.2. Materiales y Métodos.....	79
3.2.1. Obtención de datos.....	79
3.2.2. Análisis de varianza.....	81
3.2.3. Análisis de componentes principales.....	84
3.2.4. Estudio de estructura poblacional y estimación de heredabilidad.....	85
3.3. Resultados.....	87
3.3.1. Análisis de varianza.....	87
3.3.2. Análisis de componentes principales.....	92
3.3.3. Estudio de estructura poblacional y estimación de heredabilidad.....	94
3.4. Conclusiones generales del capítulo.....	95
3.5. Bibliografía citada.....	97
CAPÍTULO 4: ANÁLISIS DE PATERNIDAD.....	101

4.1. Introducción	102
4.1.1. Análisis de sistemas de apareamiento.....	102
4.1.2. Utilización de marcadores moleculares para asignación de parentescos.....	103
4.1.3. Estudios del sistema de apareamiento en cocodrilianos mediante marcadores moleculares.....	104
4.1.4. Definición y método de análisis de microsatélites.....	104
4.1.5. Objetivos e Hipótesis.....	107
4.2. Materiales y métodos	108
4.2.1. Metodología para Análisis de ADN.....	108
4.2.1.1. Obtención de muestras.....	108
4.2.1.2. Aislamiento y purificación de ADN.....	109
4.2.2. Evaluación del polimorfismo mediante cebadores específicos (microsatélites-SSR).....	109
4.2.2.1. Selección de los cebadores.....	109
4.2.2.2. Análisis de productos amplificados.....	110
4.2.2.3. Análisis de parentesco.....	111
4.3. Resultados	112
4.4 Conclusiones generales del Capítulo	119
4.5. Bibliografía citada	120
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES	124
5.1. Análisis de variabilidad	125
5.1.1. Marcadores isoenzimáticos.....	127
5.1.2. Marcadores RAPD.....	128
5.1.3. Caracteres morfométricos.....	133
5.2. Estructura genético-poblacional	135
5.2.1. Marcadores RAPD.....	136
5.2.2. Caracteres morfométricos.....	138
5.3. Heredabilidad	139
5.4. Análisis de paternidad	141
5.5. Consideraciones finales	143
5.6. Bibliografía citada	144
CAPÍTULO 6: ANEXO	149
6.1. Tablas anexas	150
6.2. Publicaciones	162
6.3. Cursos acreditados para la carrera de Doctorado	163

Índice de Tablas

Tabla 2.1: Frecuencias alélicas y estimas de variabilidad (P , A y H_o) obtenidas mediante cuatro sistemas isoenzimáticos en poblaciones santafesinas de <i>C. latirostris</i>	62
Tabla 2.2: Valores de A , P y H_e de cada población obtenidos mediante análisis de bandas en geles de agarosa (AG) y de poliacrilamida (POL). POB: poblaciones, N: número muestral.....	64
Tabla 2.3: Valores de comparación de a pares de los valores H_e en cada <i>locus</i> en cada población. (W: estadístico de Wilcoxon, *: valores significativos).....	66
Tabla 3.1: Descripción de las medidas morfométricas obtenidas en ejemplares recién nacidos de <i>Caiman latirostris</i> (adaptadas a partir del trabajo de Verdade, 2001).....	80
Tabla 3.2: Media y desvío <i>standard</i> (entre paréntesis) de las variables morfométricas en cada nido y estadísticos de ANOVA para la diferenciación entre poblaciones (F_{POB}) y entre nidos (F_{NID}). ** $P < 0.01$	88
Tabla 3.3: Representación de cada rasgo en los primeros tres componentes principales (CP), autovalores y proporción de la varianza total explicada por cada CP, obtenidos en el análisis de componentes principales.....	92
Tabla 3.4: Pruebas de ANOVA para cada CP. GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, códigos de significación: *** de 0 a 0.001, ** de 0.001 a 0.01, * de 0.01 a 0.05, . de 0.05 a 0.1.....	93
Tabla 3.5: Comparaciones de a pares entre poblaciones mediante el test de Tukey. Valores P entre paréntesis, *: valores significativos.....	93
Tabla 3.6: Componentes de varianza y valores Q_{ST} para cada rasgo.....	94
Tabla 3.7: Valores de heredabilidad estimados de cada rasgo en cada población. (+: $0.05 \leq P < 0.1$; *: $0.01 \leq P < 0.05$; **: $P < 0.01$).....	95
Tabla 4.1. Cebadores evaluados: secuencias y <i>buffers</i> óptimos para cada uno.....	109
Tabla 4.2: Condiciones óptimas de PCR para cada microsatélite.....	110
Tabla 4.3: Alelos hallados para cada <i>locus</i> en las familias analizadas.....	113
Tabla 4.4: Genotipos de la madre candidata y de los pichones de cada nido para cada <i>locus</i> . (*: genotipos de pichones que no se corresponden con el genotipo de la madre alegada). Las celdas sin datos corresponden a individuos que no exhibieron amplificación en ese locus luego de varios ensayos de PCR.....	114
Tabla 4.5: Grupos de parentales elaborados por el programa Gerud 2.0 para la familia 1. Se muestran sólo los 5 primeros grupos con mayores valores de probabilidad.....	117
Tabla 4.6: Genotipo de la madre y genotipos probables del progenitor paterno de las familias 3 y 4. Los alelos diferenciales entre los genotipos paternos se muestran en color rojo.....	117
Tabla 4.7: Número de pichones asignados para cada genotipo paterno en la familia 1. Se consideraron los genotipos paternos más probables según el análisis del programa Gerud 2.0.....	118
Tabla 5.1: Valores comparativos entre los parámetros de variabilidad obtenidos en este trabajo con los estimados por otros autores en especies relacionadas.....	129
Tabla A: Matriz binaria (1 y 0) de los marcadores RAPD que resultaron	

polimórficos, analizados en 40 ejemplares de <i>C. latirostris</i>	150
Tabla B: Frecuencias alélicas para cada población y para cada <i>locus</i> polimórfico.....	151
Tabla C: Coordenadas de los individuos en cada uno de los tres ejes canónicos más informativos en el análisis discriminante de correspondencia realizado con los marcadores RAPD.....	155
Tabla D: Carga o “peso” de cada marcador RAPD sobre cada uno de los ejes más informativos del análisis discriminante de correspondencia.....	156
Tabla E: Valores de los cosenos y calidad (suma de los cosenos al cuadrado) para cada <i>locus</i> polimórfico analizados con RAPD, en cada uno de los tres ejes que resultaron más informativos en el análisis discriminante de correspondencia. Los valores en rojo destacan los <i>loci</i> con mayor calidad estimada, es decir que son más informativos para el lote de individuos analizados.....	157
Tabla F: Grupos de posibles parentales elaborados por el programa Gerud 2.0 para los pichones correspondientes a la familia 1 a partir de sus genotipos, y el de su madre probable, determinados en cuatro <i>loci</i> microsátélites.....	158

Índice de figuras

Figura 1.1: Ejemplar adulto de <i>Caiman latirostris</i>	5
Figura 1.2: Distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i> en Argentina (Larriera <i>et al.</i> 2008).....	6
Figura 1.3: Nido y ejemplar adulto de <i>Caiman latirostris</i> en un área de monte de la provincia de Santa Fe.....	7
Figura 1.4: Ubicación dorsal de narinas y ojos en <i>Caiman latirostris</i>	8
Figura 1.5: Nido de <i>Caiman latirostris</i> en un área de sabana de la provincia de Santa Fe.....	9
Figura 1.6: Ejemplares recién nacidos de <i>Caiman latirostris</i> : a) emergiendo del huevo; b) ejemplar con 24 hs. de nacido.....	10
Figura 1.7: Huevos de <i>Caiman latirostris</i> marcados durante la recolección.....	12
Figura 1.8: Vista de la incubadora y de los cajones utilizados como soporte para los nidos durante la incubación.....	13
Figura 1.9: Marcas realizadas a los recién nacidos: a) corte de verticilos caudales; b) colocación de caravanas en las patas traseras.....	14
Figura 1.10: Liberación de juveniles de <i>Caiman latirostris</i> en un ambiente de la provincia de Santa Fe.....	15
Figura 2.1. Representación esquemática de zimogramas: a) Proteína monomérica (Ej. Esterasa) con dos alelos; b) Proteína dimérica (Ej. Aspartato Amino Transferasa) con dos alelos.....	38

Figura 2.2: Generación y visualización de las bandas de RAPD.....	40
Figura 2.3: Distribución geográfica de las poblaciones muestreadas.....	42
Figura 2.4: Geles de agarosa visualizados bajo luz UV. a) Calles 1 a 10: muestras de diez individuos de la población CSA amplificadas con el cebador A1; calle M: marcador de tamaño molecular. b) Calles 1 a 10): muestras de diez individuos de la población EDP amplificadas con el cebador B7; calle M: marcador de tamaño molecular.....	48
Figura 2.5: Geles de almidón teñidos para el revelado de SOD (a), EST (b) e IDH (c) en 7 individuos (1 a 7) y sus réplicas (1' a 7').....	61
Figura 2.6: Gel de agarosa bajo luz UV mostrando muestras de ADN de 12 individuos. Se puede observar que el ADN, en todos los casos, presenta una banda única, por lo cual se infiere que se presenta en estado nativo.....	63
Figura 2.7. Bandas RAPD amplificadas por el cebador B05, visualizadas en gel de poliacrilamida al 4% teñido con nitrato de plata. EEE, CSA, EDP y AES: productos amplificados de individuos de cada una de las poblaciones analizadas. La flecha vertical a la izquierda muestra la dirección de electroforesis, M: marcador pGem.....	64
Figura 2.8: Box-plot representando los valores comparativos de H_e en cada <i>locus</i> en cada población.....	65
Figura 2.9: Distancias genéticas de Nei (1978) entre las poblaciones analizadas.....	67
Figura 2.10: Representación de las coordenadas de las cuatro poblaciones sobre los ejes más informativos, como resultado del análisis discriminante de correspondencia.....	68
Figura 3.1: Medidas morfométricas obtenidas en ejemplares recién nacidos de <i>Caiman latirostris</i> (adaptadas a partir del trabajo de Verdade, 2001).....	80
Figura 3.2: Gráficos de caja para cada rasgo morfométrico y cada población, mostrando diferencias entre poblaciones.....	90
Figura 3.3: Gráficos de caja para cada rasgo morfométrico mostrando diferencias entre nidos.....	91
Figura 4.1: Estructura de un microsatélite mostrando el polimorfismo entre dos individuos.....	105
Figura 4.2: Un <i>locus</i> específico para un microsatélite es amplificado en el genoma A y en el genoma B con la ayuda de dos cebadores o iniciadores específicos que flanquean esta región (iniciador 1 e iniciador 2). Los	

productos de amplificación difieren en longitud entre los dos genomas (alelo 1 vs. alelo 2) y su polimorfismo puede ser detectado por electroforesis en geles de alta resolución y posterior detección con nitrato de plata, o por secuenciador automático. La técnica de SSR permite visualizar alelos específicos para discriminar entre condiciones homocigotas y heterocigotas de un alelo. P1 y P2: progenitores; F1 y F2 primera y segunda generación filial..... 106

Figura 4.3: Genotipos, designados por el tamaño de los alelos, de 8 individuos en el *locus Clap* 10 mediante comparación con tres marcadores de tamaño molecular (M1, M2 y M3)..... 113

Acerca de la organización de esta tesis

La tesis incluye seis capítulos: el Capítulo 1 consta de una Introducción General acerca de las características biológicas de *Caiman latirostris*, su distribución geográfica, su situación poblacional y sistemas de manejo a los que está sujeta esta especie en Argentina. Además se introducen comentarios generales acerca de las técnicas empleadas en el trabajo y los antecedentes de estudios similares en otras especies de cocodrilianos. El Capítulo 2 incluye análisis de variabilidad genética realizados utilizando electroforesis de isoenzimas y marcadores moleculares RAPD. En el Capítulo 3 se realizan análisis de variabilidad fenotípica a través del estudio de once caracteres morfométricos, aplicando análisis de varianza, de componentes principales, y estimando valores de heredabilidad para cada rasgo. El Capítulo 4 consta de un estudio acerca del sistema de apareamiento, mediante análisis de marcadores microsatélites, evaluando la existencia de múltiple paternidad. En el Capítulo 5 se realiza una discusión general y se incluyen las consideraciones finales de la tesis. Por último, el Capítulo 6: Anexo, consta de tablas auxiliares, publicaciones generadas a partir de esta tesis, y cursos acreditados realizados para la carrera del doctorado.

Cada uno de los capítulos técnicos incluye: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Conclusiones. La sección Conclusiones contiene la síntesis de los puntos más importantes de cada capítulo, que luego se discuten en el Capítulo 5 de Discusión General.

Abreviaturas

°C: grados centígrados

µl: microlitros

ACP: Análisis de Componentes Principales

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de Varianza

ARN: ácido ribonucleico

bandeo C: tinción diferencial cromosómica que tiñe heterocromatina constitutiva

bandeo NOR: tinción diferencial cromosómica que tiñe el organizador nucleolar

CITES: Comisión Internacional que regula el Tráfico de Especies Silvestres

ClK: cloruro de potasio

ClMg: cloruro de magnesio

ClNa: cloruro de sodio

cm: centímetros

CP: componentes principales

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

dNTPs: desoxirribonucleótidos tri-fosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

g: gramos

HCl: ácido clorhídrico

kb: kilobases

kg: kilogramos

M: molar

m: metros

ml: mililitros

mM: milimolar

ng: nanogramos

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

pM: picomolar

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar (*Random amplified polymorphic DNA*)

REML: Máxima verosimilitud restringida (*Restricted Maximum Likelihood*)

SD: desvío *Standard*

SSR: repeticiones de secuencia única (*single sequence repeats*)

Taq polimerasa: ADN polimerasa proveniente del organismo *Thermus aquaticus*

TBE: *buffer* compuesto por Tris base, ácido bórico y EDTA

TE: *buffer* compuesto por Tris base y EDTA

UPGMA: Método no ponderado de agrupamiento de pares, utilizando media aritmética

(*Unweighted Pair Group Method with arithmetic Mean*)

UV: ultravioleta

V: voltios

W: watts

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN



1.1. Descripción de la Especie

Caiman latirostris, conocido vulgarmente como “yacaré overo” o “yacaré ñato” (Fig. 1.1) es una de las 23 especies existentes dentro del Orden Crocodylia, perteneciente a la familia Alligatoridae (Ross, 1998). Entre las 10 especies de cocodrilianos que habitan Latinoamérica, *C. latirostris* es la que presenta distribución más austral, abarcando un amplio gradiente latitudinal desde los 6 °S en el noreste de Brasil, parte de Bolivia y Paraguay, hasta los 32 °S en el noreste de Argentina y Uruguay (Larriera, 1992; Verdade, 1998).



Figura 1.1: Ejemplar adulto de *C. latirostris*

El yacaré overo es una de las dos especies de cocodrilianos que habitan en Argentina, y presenta una amplia distribución geográfica que abarca nueve provincias: Formosa, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Chaco, Santiago del Estero, Salta, Jujuy y Santa Fe (Yanosky, 1990, 1992; Larriera, 1993; Larriera e Imhof, 2000; Larriera *et al.* 2008) (Fig. 1.2).

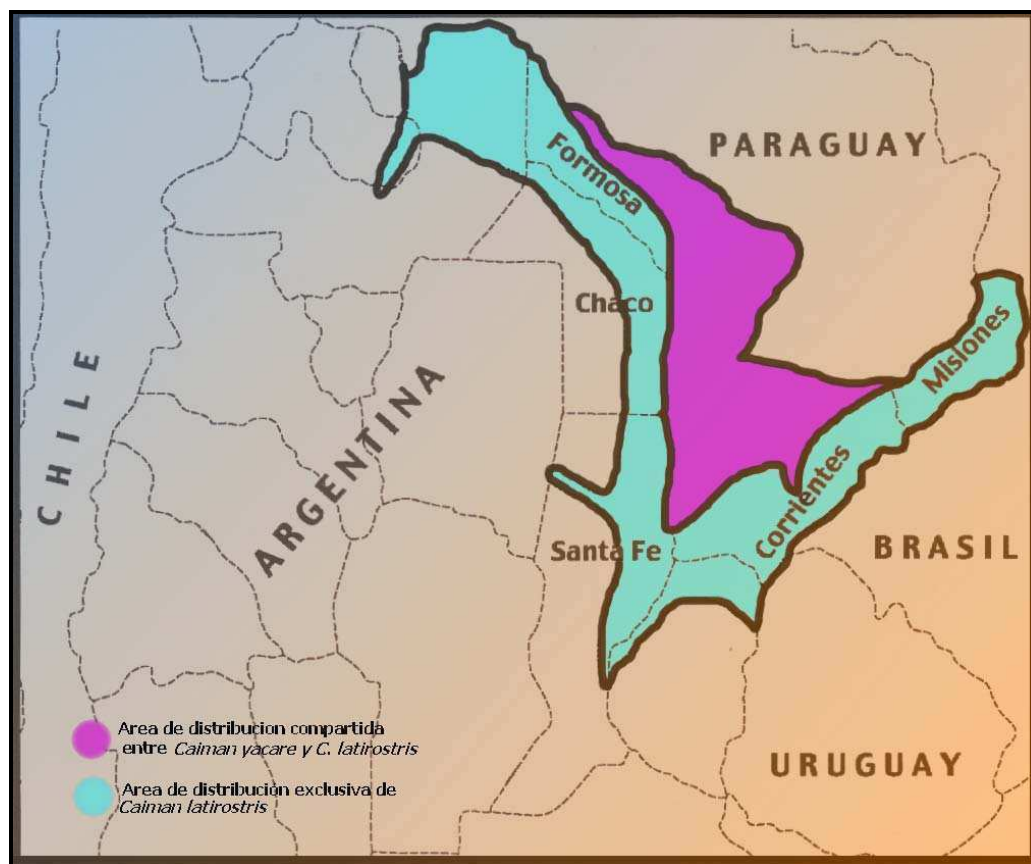


Figura 1.2: Distribución geográfica de *Caiman latirostris* en Argentina (Larriera et al. 2008)

Su extensa distribución dentro del país probablemente se deba a que esta especie presenta una buena tolerancia climática (Waller y Micucci, 1993). En la provincia de Santa Fe, *C. latirostris* habita una diversa gama de ambientes acuáticos del valle de inundación del río Paraná, de la cuenca del río Salado y de los Saladillos, (Larriera, 1995) siendo éstos, generalmente, cuerpos de agua poco profundos, fuertemente vegetados y de difícil acceso (Larriera, 1992) (Fig.1.3).



Figura 1.3: Nido y ejemplar adulto de *Caiman latirostris* en un área de monte de la provincia de Santa Fe

C. latirostris es un cocodriliano de tamaño medio. Los pichones, al nacer, pesan unos 40 gramos y miden 22 cm aproximadamente. Los machos adultos llegan a superar los dos metros de longitud (Yanosky, 1990). Algunos registros citan animales de hasta 3,20 m y de más de 80 kg de peso (Larriera y del Barco, 1992; Piña *et al.*, 1996). Su cuerpo está comprimido dorsoventralmente, su cola es musculosa y aguzada lateralmente, tiene una piel prácticamente impermeable y con manchas que generan un efecto de camuflaje, características que lo transforman en un nadador perfectamente adaptado a lugares con rica vegetación, donde gracias a sus ojos y narinas de ubicación dorsal puede pasar desapercibido tanto para potenciales presas como para predadores (Medem, 1983) (Fig. 1.4).



Figura 1.4: Ubicación dorsal de narinas y ojos en *Caiman latirostris*

Debido a sus características de ectotermo, el yacaré depende de la temperatura exterior para su termorregulación, por lo que en invierno su actividad es limitada, restringiéndose a algunas exposiciones al sol, para luego permanecer sumergido. Con la llegada de la primavera comienza a alimentarse más activamente, llegando al máximo de su actividad en la temporada reproductiva. En este período se producen disputas territoriales entre los machos, y más adelante comienzan las cópulas. Los apareamientos se producen siempre en el agua y una vez fecundadas, las hembras se alejan hacia lugares apartados, en algunos casos a muchos kilómetros de los ambientes de residencia habitual en aguas permanentes, incluso dentro del monte para construir su nido (Yanosky, 1990). Este consiste en un montículo de materia vegetal, tierra o arena y deyecciones que actúan como incubadoras naturales gracias al calor del sol y a la fermentación de los materiales (Figs. 1.3 y 1.5).



Figura 1.5: Nido de *Caiman latirostris* en un área de sabana de la provincia de Santa Fe

La temperatura en el interior del nido se mantiene prácticamente uniforme durante todo el período de incubación, que dura aproximadamente 70 días. Las posturas se producen entre principios de diciembre y mediados de enero, y en general se observan actitudes de defensa del nido por parte de la hembra, la cual se manifiesta agresiva ante la aparición de intrusos o potenciales predadores (Larriera, 1993).

En condiciones naturales se estima que sólo entre el 30 y el 50% de los huevos de la puesta finalmente eclosiona, pudiendo deberse esta mortandad embrionaria a factores ambientales, tales como inundaciones o sequías extremas, o a factores indirectos como la depredación de huevos. Además, los recién nacidos (Fig. 1.6 a y b) debido a su escasa masa corporal, quedan expuestos a los predadores naturales (garzas, cigüeñas, zorros, iguanas y caranchos), y a condiciones ambientales adversas (heladas) por lo que el porcentaje de pérdidas por nido se incrementa aún más. Se estima que sólo el 10% de los animales nacidos alcanza el primer año de vida. Este hecho se condice con la

estrategia reproductiva de la especie, que como la mayoría de los reptiles, consiste en producir abundante, aunque frágil, descendencia, para garantizar la supervivencia de sólo un porcentaje de la misma (Larriera, 1991).



Figura 1.6: Ejemplares recién nacidos de *Caiman latirostris*: a) emergiendo del huevo; b) ejemplar con 24 hs. de nacido.

Tomando en cuenta su rol como consumidor carnívoro de ubicación superior en las redes tróficas, se podría considerar al yacaré overo como especie “bandera” en los ecosistemas regionales. Una especie bandera es aquella cuya conservación *in situ* resulta en la conservación de un número significativo de otras especies y el mantenimiento de los ecosistemas naturales en buen estado de funcionamiento, es decir que su viabilidad garantiza la del sistema (Caro y O’Doherty, 1998).

1.2. Situación poblacional y Planes de Manejo

Las poblaciones silvestres santafesinas de *C. latirostris* son objeto de manejo en el marco de las actividades del Proyecto Yacaré, programa de monitoreo y

autorreplamamiento que se inició en la provincia de Santa Fe en 1990 para la preservación de esta especie y la explotación racional de caracteres de interés comercial. Los objetivos iniciales del Proyecto fueron recuperar la situación poblacional del yacaré overo, debido a que sus poblaciones estaban numéricamente reducidas a causa de una drástica pérdida de hábitat, debido al avance de la frontera agrícola, de canalizaciones y construcción de represas, sumados a un efecto de sobrecaptura por caza de subsistencia (Ubeda y Grigera, 2003; Larriera e Imhof, 2006). A la vez, se propuso garantizar, de modo indirecto, la conservación de los ecosistemas que la especie comparte con gran cantidad de aves, otros reptiles y mamíferos igualmente asociados a los humedales. El término "humedales" refiere a una amplia variedad de hábitats interiores, costeros y marinos. Generalmente se los identifica como áreas que se inundan temporariamente, donde el agua subterránea aflora en la superficie o suelos de baja permeabilidad cubiertos por agua poco profunda. Estas áreas comparten una propiedad primordial: el agua posee un rol fundamental en la determinación de su estructura y funciones ecológicas (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 2006). En la provincia de Santa Fe se han descripto diferentes tipos de humedales donde se distribuye y nidifica *C. latirostris*: albardones, embalsados, esteros, cuerpos de agua artificiales y bosques (Larriera, 1995).

La protección de áreas de reserva o santuarios y las prohibiciones resultan insuficientes para conservar ecosistemas ya que las demandas de la sociedad se incrementan de manera sostenida. Por ello se considera que uno de los mejores mecanismos para disminuir o anular el ritmo de modificación ambiental con fines lucrativos, es transformar en "productivos" los ambientes en riesgo de desaparecer. La valorización en términos económicos de la naturaleza, es hoy el fundamento del "Uso Sostenible" impulsado por la Unión Mundial para la Conservación (Larriera e Imhof, 2000).

Siguiendo esta línea de trabajo, en el Proyecto Yacaré se utiliza, desde su inicio, el sistema de ranqueo (*ranching*) o “cosecha de huevos silvestres para cría en granjas”. Este método consiste en mantener los reproductores en la naturaleza, extrayendo solamente los huevos de *C. latirostris*, y retornando al medio silvestre, un año después, los animales nacidos en cautiverio, que en condiciones naturales no sobrevivirían. Utilizando la técnica de incubación artificial y crianza de los pichones en un ambiente controlado se eliminan los factores de mortalidad, obteniéndose un número significativamente mayor de individuos viables (Larriera, 1994).

En Santa Fe, la recolección de los huevos se realiza a caballo, o a pie, utilizando embarcaciones pequeñas y en algunos casos usando helicópteros. Aproximadamente el 80% de los huevos son recolectados durante la primer semana de desarrollo embrionario. En el momento de la cosecha, los huevos son marcados (Fig. 1.7) a fin de no alterar la posición en la que fueron puestos para no producir daños al embrión.



Figura 1.7: Huevos de *Caiman latirostris* marcados durante la recolección.

Luego los huevos son trasladados, utilizando recipientes con material vegetal para evitar su movimiento, hasta la Estación Zoológica Experimental (Granja La Esmeralda) de la ciudad de Santa Fe, donde se realiza la incubación y cría (Fig. 1.8).



Figura 1.8: Vista de la incubadora y de los cajones utilizados como soporte para los nidos durante la incubación.

La temperatura de incubación es de 31.5 °C, la cual es estrictamente controlada debido a que esta especie posee determinación sexual por temperatura y la modificación de la misma podría producir un porcentaje diferencial entre hembras y machos (Piña *et al.*, 2003). La humedad se mantiene entre 95 y 98%. Al nacer, los animales de cada nido son marcados mediante el corte de verticilos caudales e individualmente identificados utilizando caravanas metálicas numeradas (Fig. 1.9) (Larriera, 1994).

Los pichones se alojan en habitáculos climatizados con un gradiente térmico entre 29 °C y 32 °C con la mitad de la superficie cubierta por agua. La alimentación se provee seis veces por semana *ad libitum* y consiste en una mezcla húmeda de carne y vísceras bovinas o bien de desechos de peladeros de pollos en una proporción de 50%, donde el 50% restante es un alimento balanceado seco con una formulación particular. La cantidad de alimento suministrada corresponde al 25% del peso de los animales por semana, durante todo el período de cría (Larriera, 1994).

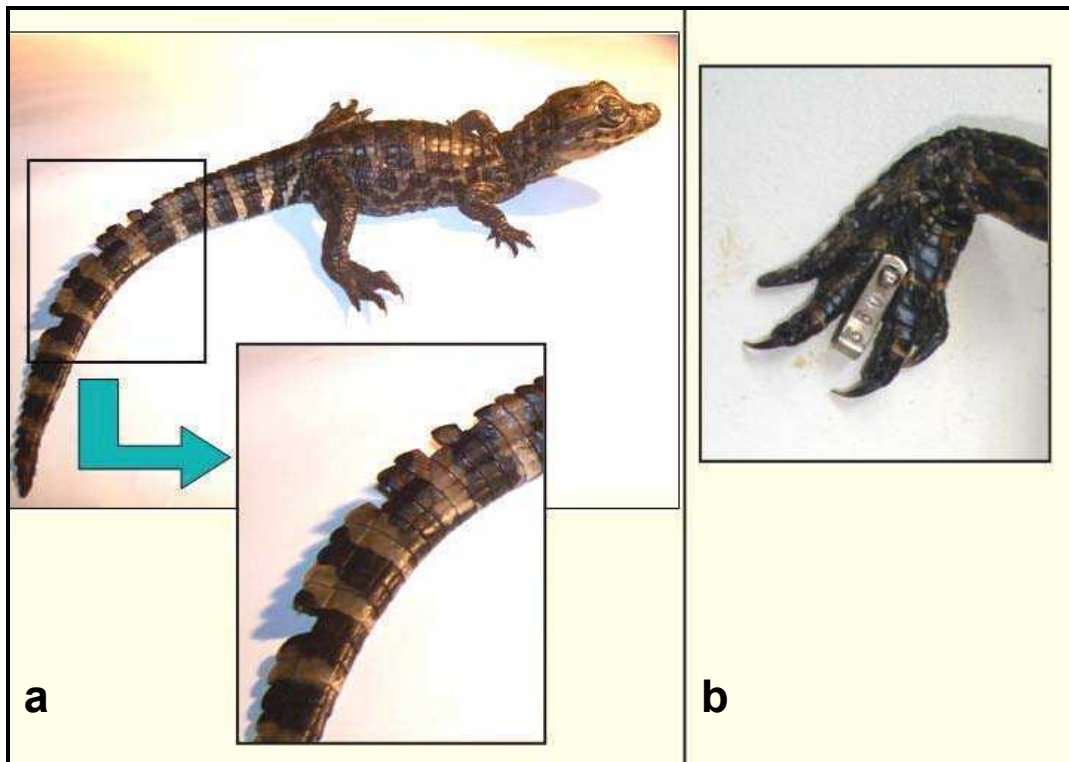


Figura 1.9: Marcas realizadas a los recién nacidos: a) corte de verticilos caudales; b) colocación de caravanas en las patas traseras.

En el mes de noviembre se devuelve a la naturaleza un porcentaje de los animales nacidos en ese año, que se determina en función de la situación de la población a partir de la cual se cosechan los huevos. Se libera un número mayor de individuos en las áreas donde la densidad poblacional es relativamente baja o en sitios de cosecha recientes, como medida precautoria, hasta recabar más datos poblacionales del sitio. Para la liberación se respeta el origen de los nidos, es decir, los individuos son liberados en el mismo sitio donde fueron cosechados los huevos (Fig. 1.10). Si por causas ambientales el curso de agua original hubiera desaparecido, los animales se liberan en el lugar húmedo más cercano al de postura (Larriera, 1994).



Figura 1.10: Liberación de juveniles de *Caiman latirostris* en un ambiente de la provincia de Santa Fe

La franca recuperación numérica de las poblaciones de yacaré overo a partir de estos trabajos, permitió que en la X Conferencia de las partes de CITES (Comisión Internacional que regula el Tráfico de Especies Silvestres) realizada en 1997 en Zimbabwe, se decidiera el cambio en el status poblacional de esta especie en Argentina, a través de su incorporación al Apéndice II permitiendo su explotación comercial por el sistema de ranqueo. Este marco legal permite su comercio estrictamente regulado, ya que una fracción de los animales nacidos a partir de los huevos cosechados, puede ser derivada al engorde comercial, produciendo un retorno económico a quienes favorecen la conservación del humedal (Larriera, 1998). Actualmente existen otros programas de manejo de la especie utilizando el sistema de *ranching* en las provincias de Chaco, Corrientes y Formosa.

Con la puesta en práctica de la etapa comercial, *C. latirostris* se ha convertido en una especie de gran importancia económica, a nivel nacional e internacional debido a la calidad de sus productos. Actualmente se comercializan entre todos los criaderos provinciales, aproximadamente 7.000 cueros por año siendo el 95% de los mismos vendidos en el mercado interno argentino y el 5 % restante se exporta particularmente a Italia y Francia. Además se produce un promedio de 15.000 kgs. de carne anuales, consumiéndose el 70% en las provincias productoras y el 30% en Buenos Aires (Larriera, com. pers.).

1.3. Marcadores genéticos: descripción e importancia

En la caracterización de poblaciones naturales es fundamental el conocimiento y medida de la variabilidad genética existente ya que ésta se relaciona con la dinámica de variables ecológicas y etológicas (Burke, 1991). Los datos de variación genética permiten predecir el comportamiento de las poblaciones locales a través del tiempo, ya que un nivel considerable de variación aumenta la capacidad de la especie para adaptarse a cambios ambientales (Mayr, 1963), y esto es determinante en la aplicación de estrategias de manejo y conservación. Para el análisis de variabilidad se utilizan frecuentemente marcadores genéticos (Awise, 1994), bioquímicos, moleculares, etc.; entendiéndose como marcador genético a cualquier característica fenotípica de herencia mendeliana simple, usada para inferir el genotipo de un organismo y sobre la cual los efectos ambientales son ínfimos o nulos (Murphy *et al.*, 1996).

Los marcadores moleculares pueden tratarse de genes o segmentos no codificantes de ADN cuya existencia en el individuo de interés se puede determinar utilizando diferentes metodologías, como la presencia de una banda coloreada en un gel, o por medio de aparatos de secuenciación que permiten separar las bandas y con una salida de datos digitales que se pueden analizar mediante programas informáticos. Las características deseables en un marcador utilizado para detectar variabilidad son: eficacia

en la detección de todos los genotipos posibles en la población; distribución frecuente en el genoma de los individuos; alta reproducibilidad; sencillez en su aplicación e interpretación y posibilidad de intercambiar datos obtenidos entre laboratorios.

1.3.1. Marcadores bioquímicos

Las primeras estimaciones de variabilidad genética se basaron en análisis electroforéticos de proteínas (isoenzimas). Esta técnica, utilizada en el presente trabajo, separa proteínas de acuerdo a su carga neta y peso molecular. La electroforesis permite distinguir entre diferentes formas de proteínas y medir el nivel de variación genética para una proteína en un *locus* particular (Frankham *et al.*, 2002). Debido a su bajo costo, facilidad de uso y la cantidad de *loci* que puede examinar, el polimorfismo proteínico revelado con electroforesis en gel y técnicas de tinción específicas, es uno de los métodos más ampliamente utilizado para investigar los niveles de variabilidad genética en poblaciones naturales (Lewontin, 1991). Además permite distinguir individuos homocigotas y heterocigotas ya que la expresión de las variantes alélicas es codominante (Murphy *et al.*, 1996), es decir que un individuo heterocigota para una mutación producirá dos tipos de polipéptidos que podrán distinguirse por su velocidad de migración. Sin embargo, esta técnica presenta dos limitaciones, la primera es que sólo revela mutaciones que dan como resultado el cambio de un aminoácido con un tipo de carga por otro con un tipo de carga distinto, es decir que no detecta mutaciones silenciosas, ni aquéllas que sustituyen un aminoácido por otro con la misma carga; por lo tanto, la técnica usualmente subestima los niveles de variabilidad genética. La segunda limitación es que sólo se puede estudiar la parte del genoma que corresponde a genes estructurales, los cuales pueden estar sujetos a selección natural y, por consiguiente, violar el supuesto de la neutralidad de los marcadores del cual parten los modelos matemáticos que permiten el análisis de datos (Lewontin, 1991; Avise, 1994).

1.3.2. Marcadores moleculares

Otro tipo de marcadores genéticos son aquellos que se basan en la posibilidad de amplificar diferentes secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este procedimiento utiliza la enzima ADN polimerasa para construir secuencias de ADN complementario, comenzando en el sitio donde otro segmento de ADN, el cebador, se ha unido a la molécula molde. Este proceso se repite numerosas veces dando como resultado grandes cantidades de copias exactas de cada fragmento de ADN, lo que permite visualizarlos mediante una simple tinción después de una electroforesis en gel. Los fragmentos amplificados provenientes de diferentes individuos pueden variar en tamaño o estructura debido a la existencia de mutaciones en su ADN. Bajo la teoría de la neutralidad, las mutaciones son neutras, es decir que no confieren niveles de aptitud diferenciales a sus portadores (Kimura, 1991). A partir de esta teoría, los marcadores moleculares son considerados neutros debido a que generalmente detectan variaciones no codificantes que poseen efectos equivalentes entre sí sobre la aptitud de los portadores (Avice, 1994).

Existen muchas y variadas metodologías para medir, directa o indirectamente variación en la secuencia de bases del ADN. Una de ellas, utilizada en estudios genético-poblacionales, y empleada en este trabajo, es la de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Otra técnica molecular, seleccionada actualmente como metodología de elección para la detección de polimorfismos, es la de microsatélites (SSR, *single sequence repeats*), que se utiliza en este trabajo para estudios de paternidad.

1.3.2.1. RAPD

Utiliza cebadores (*primers*) de 10 a 20 pares de bases de longitud para amplificar muestras de ADN nuclear. Los productos amplificados se analizan en geles, donde típicamente se detectan varias bandas que representan diferentes fragmentos (*loci*) amplificados. Si hay variación en los sitios de pegado del cebador, algunas bandas

revelarán patrones de presencia/ausencia. Esta técnica analiza muchos *loci* sin la necesidad de secuenciar el genoma ni diseñar cebadores específicos para el objeto de estudio. Sus desventajas son el modo dominante de herencia y el considerable cuidado requerido en los protocolos para obtener resultados repetibles (Hadrys *et al.*, 1992).

1.3.2.2. Microsatélites (SSR)

Estos marcadores consisten en motivos de uno a cinco pares de bases repetidos en tándem ampliamente distribuidos en los genomas (Tautz y Schlöterer, 1994) que al ser muy polimórficos son una herramienta muy importante en el análisis de variabilidad poblacional, así como de relaciones de parentesco entre individuos (Bruford y Wayne, 1993). Para su amplificación se utilizan cebadores de secuencia específica complementaria de la región flanqueante a los microsatélites. Los productos amplificados son analizados en geles corrientes o utilizando secuenciadores automáticos. Los microsatélites tienen la ventaja sobre otros marcadores de ser codominantes y altamente variables, por lo que se han convertido en marcadores de elección en estudios poblacionales, desplazando a técnicas muy populares anteriormente tales como la “huella digital de ADN” (*DNA fingerprinting*) y RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*). Su desventaja es que los cebadores para amplificarlos deben ser desarrollados específicamente para cada especie, lo que dificulta y encarece su aplicación.

1.4. Antecedentes

Los métodos de análisis moleculares, en particular en los cocodrilianos (Forstner y Forstner, 2002) han aportado valiosos datos sobre mecanismos reproductivos, migración, tamaños efectivos poblacionales, distribución geográfica y medidas de variabilidad genética, todos ellos recursos fundamentales para la selección de estrategias de manejo apropiadas. Los estudios moleculares más importantes en cocodrilianos involucran diferentes tipos de técnicas. La mayor parte de los trabajos realizados tienen como objeto

de estudio a *Alligator mississippiensis* (caiman americano), existiendo escasos antecedentes en yacaré overo.

1.4.1. Análisis isoenzimáticos

Inicialmente se desarrollaron análisis isoenzimáticos en poblaciones naturales de *A. mississippiensis* (Gartside *et al.*, 1976; Menzies, 1979; Adams *et al.*, 1980; Lawson *et al.*, 1989). Estos trabajos indicaron que existe un bajo porcentaje de heterocigosis, hecho que los autores atribuyeron a los importantes “cuellos de botella” (deriva genética) que sufrieron las poblaciones durante varias décadas, sumado a características intrínsecas de la especie, tales como gran tamaño y longevidad (Gartside *et al.*, 1976; Lawson *et al.*, 1989). Estos análisis, aplicados posteriormente a otras especies (Jurgens *et al.*, 1994; Flint *et al.*, 2000), indicaron que los cocodrilianos, en general, presentaban escasos *loci* polimórficos.

1.4.2. Análisis de ADN

En cuanto a los análisis realizados utilizando ADN en cocodrilos, inicialmente se utilizaron sondas, desarrollando la metodología de *fingerprinting* (huella digital) de ADN para el establecimiento de genealogías en *A. mississippiensis*, así como de relaciones filogenéticas entre varias especies de cocodrilianos (Aggarwall *et al.*, 1992, 1994; Lang *et al.*, 1992). Además, se han realizado estudios en genes mitocondriales: Densmore y White (1991) analizaron relaciones filogenéticas de cocodrilianos, incluyendo al género *Caiman*, y luego, Janke y Arnason (1997), secuenciaron completamente el genoma mitocondrial de *A. mississippiensis* y estimaron que su tasa evolutiva es similar a la de los mamíferos. Posteriormente, Ray y Densmore (2002) describieron la estructura completa de la región control mitocondrial (*D-loop*), y Glenn *et al.* (2002) hallaron baja variación entre poblaciones de *A. mississippiensis*. Por el contrario, Ray *et al.* (2000) y Farias *et al.* (2004) estimaron alta variabilidad en *Osteolaemus tetraspis tetraspis*, y buena diferenciación en poblaciones de *Melanosuchus niger* y de *Caiman crocodylus*

respectivamente. Más recientemente, Yan *et al.* (2005) lograron identificar, entre diferentes tipos de carnes para consumo, a aquella perteneciente a *Alligator sinensis*, a través de la amplificación por PCR múltiple, del gen del citocromo b mitocondrial, utilizando cebadores específicamente diseñados para la especie. Además utilizaron dos cebadores universales para la amplificación del segmento L14724 y H15175 del gen 12S del ARN ribosómico.

En cuanto a la aplicación de la técnica de RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), existen escasos antecedentes de trabajos en este orden de reptiles y las aplicaciones de esta técnica fueron realizadas en el género *Alligator* (Glenn *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002) y en *Crocodylus acutus* (Porrás Murillo *et al.*, 2008).

Recientemente se comenzaron a utilizar los microsatélites en poblaciones naturales de cocodrilianos. Varios autores, aplicando estos marcadores, determinaron valores de variabilidad mucho más altos a los obtenidos mediante los métodos antes citados (Davis *et al.*, 2000, 2002; Glenn *et al.*, 1998; Fitzsimmons *et al.*, 2000, 2002; Dever *et al.*, 2002). Además, otros autores (Davis *et al.*, 2001; Isberg *et al.*, 2004a; Mc Vay *et al.*, 2008), han utilizado la amplificación de microsatélites para estudios de genealogías y sistemas de apareamiento en cocodrilianos, temática desarrollada en el presente trabajo.

1.4.3. Estudios genéticos en yacaré overo en Argentina

En nuestro país se registran escasos antecedentes de trabajos genéticos en *C. latirostris*. Uno de ellos consiste en un análisis comparativo de la estructura cariotípica con *Caiman yacare*, la otra especie de yacaré argentina (Amavet *et al.*, 2003). Los resultados demuestran una gran semejanza entre ellas, con un número diploide de 42 cromosomas, conformados por 12 pares telocéntricos y 9 pares bbraquiales, dos de los cuales son microcromosomas. Ambas especies carecen de diferenciación de cromosomas sexuales, y presentan patrones de bandeo C y NOR muy similares. Estos datos concuerdan con los obtenidos por bandeos simples y análisis biométricos en *C.*

latirostris en Brasil (Lui *et al.*, 1993), pero no con la determinación de la estructura cariotípica realizada en todas las especies de cocodrilianos (Cohen y Gans, 1970), debido a que se observaron microcromosomas.

En cuanto al uso de técnicas moleculares, se han efectuado estudios poblacionales en Brasil, mediante el uso de microsatélites desarrollados especialmente para esta especie (Zucoloto *et al.*, 2002, 2003). Verdade *et al.* (2002), aplicando dichos marcadores específicos, analizaron la estructura poblacional de *C. latirostris* en una región del estado de San Pablo, y detectaron una variación microgeográfica entre poblaciones. Posteriormente, Villela (2004) halló altos niveles de diversidad genética y heterocigosis en poblaciones brasileñas. Por el contrario, en nuestro país no se cuenta con datos acerca de diferenciación específica, variabilidad, estructura genética ni sistemas de apareamiento en *C. latirostris*.

1.4.4. Estudios morfométricos

En relación con el estudio de medidas morfométricas en esta especie se pueden citar trabajos de Verdade (1997, 2000, 2001), quien analizó medidas del tamaño del cuerpo y de la cabeza en *C. latirostris*, así como medidas relativas (proporciones entre medidas absolutas) a diferentes edades. El autor además relacionó medidas morfométricas de hembras con medidas de sus pichones. En Argentina, Piña *et al.* (2007) realizaron análisis morfométricos utilizando medidas craneales en neonatos de *C. latirostris*. Los autores hallaron indicios de dimorfismo sexual utilizando análisis multivariado de los datos morfométricos recabados. Monteiro *et al.* (1997) analizaron los cambios ontogenéticos en la forma del cráneo de *C. latirostris* junto a otros dos caimanes. Existen otros autores que realizaron análisis semejantes aplicados a otras especies de cocodrilianos tales como Montague (1984), Miranda *et al.* (2002), e Isberg *et al.* (2004b).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivos generales

El objetivo principal en la realización de este trabajo fue conocer la estructura y variabilidad genética existente dentro y entre poblaciones silvestres de *Caiman latirostris* de la provincia de Santa Fe. La obtención de dicha información se consideró necesaria y prioritaria debido a la escasez de antecedentes genéticos en nuestro país en esta especie. Además, un estudio genético profundo de las poblaciones silvestres santafesinas se juzgó fundamental para establecer la mejor estrategia de explotación, manejo y conservación de esta especie autóctona.

Conjuntamente, este trabajo tuvo como objetivo aportar al conocimiento de la biología de esta especie autóctona, y consecuentemente, a la caracterización, conservación y manejo de los ecosistemas regionales que habita.

Para lograr cumplir con estos objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos particulares.

1.5.2. Objetivos particulares

- a) Ajustar la metodología de las técnicas de isoenzimas, RAPD y microsatélites a esta especie, lo cual no tiene antecedentes en nuestro país.
- b) Determinar el número probable de *loci* y alelos por *locus* en sistemas isoenzimáticos.
- c) Buscar *loci* diagnósticos (isoenzimáticos y RAPD) que permitan identificar poblaciones.
- d) Analizar parámetros de variabilidad y estructura genética dentro y entre poblaciones teniendo en cuenta el grado de divergencia y flujo génico por medio de las técnicas de isoenzimas y RAPD.
- e) Estimar parámetros de variabilidad y estructura genético-poblacional a partir del análisis de rasgos morfométricos.

- d) Estudiar el sistema de apareamiento en ejemplares de *C. latirostris* y evaluar la existencia de multipaternidad, utilizando la técnica de SSR.

1.6. Bibliografía citada

- Adams, S.E.; Smith, M.H.; Baccus, R.1980. Biochemical variation in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Herpetologica* 36 (4): 289-296.
- Aggarwall, R.K.; Lang, J.W.; Singh, L. 1992. Isolation of high –molecular-weight DNA from small samples of blood having nucleated erythrocytes, collected, transported, and stored at room temperature. *GATA* 9 (2): 54-57.
- Aggarwall, R.K.; Majumdar, K.C.; Lang, J.W.; Singh, L. 1994. Generic affinities among crocodylians as revealed by DNA fingerprinting with a Bkm-derived probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91:10601-10605.
- Amavet, P.; Markariani, R.; Fenocchio, A. 2003. Comparative Cytogenetic Analysis of the American Alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia* 56 (4): 489-493.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York, USA.
- Burke, J.S. 1991. Influence of abiotic factors and feeding on habitat selection of summer and southern flounder during colonization of nursery grounds. PhD dissertation. Carolina State University, Raleigh, USA.
- Bruford, M. W.; Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 939-943.
- Caro, T.M.; O'Doherty, G.O. 1998. On the use of surrogate species in Conservation Biology. *Conservation Biology* 13 (4): 805-814.
- Cohen M. M.; Gans C. 1970. The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetics* 9: 81 -105.

- Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Elsey, R.M.; Brisbin Jr, I.L.; Rhodes, W.E.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2000. Genetic structure of six populations of American alligators: a microsatellite analysis. En: Grigg, G.; Seebacher, F.; Franklin, C.E. (Eds.). *Crocodylian Biology Evolution*. Surrey Beatty and sons, Chipping Norton, UK: 38-50.
- Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Elsey, R.M.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Molecular Ecology* 10: 1011-1024.
- Davis, L.M., Glenn, T.C., Strickland, D.C., Guillette, L.J. Jr, Elsey, R.M., Rhodes, W.E., Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2002. Microsatellite DNA analysis support an east-west phylogeographic split of American alligator populations. *Journal of Experimental Zoology* 294 (4): 352-72.
- Densmore III, L.D.; White, P.S. 1991. The systematic and evolution of the Crocodylia as suggested by restriction endonuclease analysis of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA. *Copeia* (3): 602-615.
- Dever, J.A.; Strauss, R.E.; Rainwater, T.R.; McMurry, S.T.; Densmore, L.R. 2002. Genetic Diversity, Population Subdivision, and Gene Flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* : 1078–1091.
- Farias, I.P.; Da Silveira, R.; de Thoisy, B.; Monjeló, L.A., Thonrbjarnarson, J.; Hrbek, T. 2004. Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodilians. *Animal Conservation* 7: 265-272.
- FitzSimmons, N.N.; Tanksley, S.; Forstner, M.R.J.; Louis, E.E.; Daglish, R.; Gratten, J.; Davis, S. 2000. Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. En: Grigg, G.; Seebacher, F.; Franklin, C.E. (Eds.). *Crocodylian Biology Evolution*. Surrey Beatty and sons, Chipping Norton, UK: 51-57.

- Fitzsimmons, N.; Buchan, J.C.; Lam, P.V.; Polet, G.; Hung, T.T.; Thang, N.Q.; Gratten, J. 2002. Identification of purebred *Crocodylus siamensis* for reintroduction in Vietnam. *Journal of Experimental Zoology* 294 (4): 373-381.
- Flint, N.S.; van der Bank, F.H.; Grobler, J.P. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile Crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA* 26: 105-110.
- Forstner, M.R.J.; Fortsner, J.M.K. 2002. La utilidad del ADN en la conservación de los Crocodylia. En: Larriera, A.; Verdade, L. (Eds.). *Conservação e Manejo de Jacarés e Cocodrilos da America Latina- La Conservación y el Manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina*. Vol. II. C.N. Editoria. Piracicaba, Brasil: 99-117.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gartside, D.F.; Dessauer, H.C.; Joanen, T. 1976. Genic homozygosity in an ancient reptile (*Alligator mississippiensis*). *Biochemical Genetics* 15: 655-663.
- Glenn, T.C.; Dessauer, H.C.; Braun, M.J. 1998. Characterization of microsatellite DNA loci in American Alligators. *Copeia* (3): 591-60
- Glenn, T.C.; Staton, J.L.; Vu, A.T.; Davis, L.M.; Alvarado Bremer, J.R.; Rhodes, W.E.; Brisbin Jr, L.; Sawyer, R.H. 2002. Low Mitochondrial DNA Variation among American Alligators and a Novel Non-Coding Region in Crocodylians. *Journal of Experimental Zoology* 294: 312–324.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1 (1): 55–63.
- Isberg, S.R.; Chen, Y.; Barker, S.G.; Moran, C. 2004a. Analysis of microsatellites and parentage testing in saltwater crocodiles. *Journal of Heredity* 95:445-449.
- Isberg, S.; Thomson, P.; Nicholas, F.; Barker, S.; Moran, C. 2004b. Farmed saltwater crocodile. A genetic improvement program. Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, Sydney, Australia.

- Janke, A.; Arnason, U. 1997. The complete mitochondrial Genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent Archosauria (Birds and Crocodiles). *Molecular Biology and Evolution* 14 (2): 1266-1272.
- Jurgens, A.; Kruger, J.; van der Bank, F.H. 1994. Allozyme variation in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) from Southern Africa. *Crocodiles. Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. IUCN- The World Conservation Union, Gland, Switzerland: 72-76.*
- Kimura, M. 1991. Recent developments of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 88: 5969-5973.
- Lang, J.W.; Aggarwall, R.K.; Majumdar, K.C.; Singh, L. 1992. Individualization and estimation of relatedness in crocodilians by DNA fingerprinting with a Bkm-derived probe. *Molecular and General Genetics* 238: 49-58.
- Larriera, A. 1991. Cría en granjas: una alternativa de manejo para los caimanes argentinos (Revisión bibliográfica). *Revista Argentina de Producción Animal* 11: 479-484.
- Larriera, A. 1992. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en la Argentina. *Anais do II Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-Papo-Amarelo (Caiman latirostris). CIZBAS/ESALQ, Universidade de Sao Paulo. Piracicaba, Brasil: 8-17.*
- Larriera, 1993. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: Verdade, L.M.; Packer, I.U.; Rocha, M.B.; Molina, F.B. Duarte, P.G.; Lula, L.A.B.M. (Eds.). *Anais do 3º Workshop sobre Conservação e manejo do Jacaré-de-papo-amarelo. CIZBAS/ESALQ. Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil: 61-69.*
- Larriera, A. 1994. *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina, with the aim of management. *Crocodiles. Proceedings of the 12th Working Meeting of the CSG/IUCN. The World Conservation Union, Gland, Switzerland: 188-198.*

- Larriera, A. 1995. Áreas de nidificación y momento óptimo de cosecha de huevos de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: Larriera, A. y Verdade, L.M. (Eds.). La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina, Vol. 1 Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Argentina: 221-232.
- Larriera, 1998. The *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina. The first commercial rearing. Crocodiles. Proceedings of the 14th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission of IUCN, The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK: 379-385.
- Larriera, A.; del Barco, D. 1992. Observaciones sobre el crecimiento de *Caiman latirostris* (DAUDIN 1802) nacidos en cautiverio (Reptilia, Alligatoridae). Acta Zoológica Lilloana 41: 329-339.
- Larriera, A.; Imhof, A. 2000. Proyecto Yacaré, Santa Fe, Argentina: A sustainable use proposal. Crocodiles. Proceedings of the 15th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission of IUCN, The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK: 311-313.
- Larriera, A.; Imhof, A. 2006. Proyecto Yacaré: Cosecha de huevos para cría en granjas, del género *Caiman* en la Argentina. En: Bolkovic, M.; Ramadori, E. (Eds.). Manejo de fauna silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina: 51-64.
- Larriera, A.L.; Imhof, A.; Siroski, P. 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo del género *Caiman* en Argentina. En: Castroviejo, J.; Ayarzagüena, J.; Velasco, A. (Eds.). Contribución al conocimiento del Género *Caiman* de Suramérica, Publicaciones Asociación Amigos de Doña Ana 18: 143-179.
- Lawson, R.; Kofron, C.P.; Dessauer, H.C. 1989 Allozyme variation in a natural population of the Nile Crocodile. American Zoologist 29: 863-871.
- Lewontin, R. C. 1991. Biology as ideology: The doctrine of DNA. Harper Collins. New

York, USA.

- Lui, J. F.; Tapia Valencia, E.F.; Boer, J.A. 1993. Karyotypic analysis and chromosome biometry of cell cultures of the yellow throated Alligator (*Caiman latirostris* DAUDIN). *Revista Brasileira de Genetica* 17 (2):165 - 169.
- Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, USA.
- McVay, J.D.; Rodriguez, D.; Rainwater, T.R.; Dever, J.A.; Platt, S.G.; McMurry, S.T.; Forstner, M.R.J.; Densmore, L.D. 2008. Evidence of multiple paternity in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, inferred from microsatellite markers. *Journal of Experimental Zoology* 309 A: 643-648.
- Medem, F. 1983. *Los Crocodylia de Sur América II*. Ed. Carrera, Bogotá, Colombia.
- Menzies, R.A.; Kushlan, J.; Dessauer, H.C. 1979. Low degree of genetic variability in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Isozyme Bulletin* 12: 61.
- Miranda, M.P.; Vanini de Moraes, G.; Nunes Martins, E.; Pinto Maia, L.C. ; Rus Barbosa, O. 2002. Thermic variation in incubation and development of Pantanal Caiman (*Caiman crocodilus yacare*) (Daudin, 1802) kept in metabolic box. *Brazilian archives of Biology and Technology* 45 (3): 333-342.
- Montague, J.J. 1984. Morphometric analysis of *Crocodylus novaeguineae* from the Fly River Drainage, Papua New Guinea. *Australian Wildlife Research* 11(2): 395-414.
- Monteiro, L.R.; Cavalcanti, M.J.; Sommer, H.J.S. 1997. Comparative ontogenetic shape changes in the skull of *Caiman* species (Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Morphology* 231: 53-62.
- Murphy, R.W.; Sites, J.W.; Buth, D.G.; Haufler, C.H. 1996. Proteins: Isozyme electrophoresis. En: Hillis, D.M; Moritz, C.; Mable, B.K. (Eds.). *Molecular Systematics*. 2nd Edition, Sinauer Associates Press, Sunderland, Massachusetts, USA: 51-120.

- Piña, C.I.; Imhof, A.; Siroski, P. 1996. Eggs size in *Caiman latirostris* and its effects on clutch size, hatch success, survivorship and growth. Crocodiles. Proceedings of the 13th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN - The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK: 254-261.
- Piña, C.I.; Larriera, A.; Cabrera, M.R. 2003. Effect of incubation temperature on incubation period, sex ratio, hatching success and survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). Journal of Herpetology 37(1): 199-202.
- Piña, C.; Larriera, A.; Siroski, P.; Verdade, L.M. 2007. Cranial sexual discrimination in hatchling broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). Iheringia Série Zoologia 97:17-20.
- Porras Murillo, L.P.; Bolaños, J.R.; Barr, B.R. 2008. Variación genética y flujo de genes entre poblaciones de *Crocodylus acutus* (Crocodylia: Crocodylidae) en tres ríos del Pacífico Central, Costa Rica. Revista de Biología Tropical 56 (3): 1471-1480.
- Ray D.A.; White, P.S.; Duong, H.V.; Cullen, T.; Densmore, L.D. 2000. High levels of genetic variability in west African dwarf crocodiles *Osteolaemus tetraspis tetraspis*. En: Grigg, G.; Seebacher, F.; Franklin, C.E (Eds.). Crocodylian Biology and Evolution. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, UK: 58-63.
- Ray, D.A.; Densmore, L.D. 2002. The crocodylian mitochondrial control region: General structure, conserved sequences and evolutionary implications. Journal of Experimental Zoology 294: 334–345.
- Ross, P. 1998. Status survey and conservation Action Plan: Revised action Plan for Crocodiles. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. 2006. Los humedales de la República Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- Tautz, D. Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. Current Opinion in Genetics and Development 4: 832-837.
- Ubeda, C.; Grigera, D. 2003. Análisis de la evaluación más reciente del estado de conservación de los anfibios y reptiles de Argentina. Gayana 67 (1): 97-113.

- Verdade, L.M. 1997. Morphometric analysis of the Broad-snout caiman (*Caiman latirostris*): An assessment of individual's Clutch, Body size, Sex, Age, and Area of origin. Ph. D Dissertation, Univ. of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- Verdade, L.M. 1998. *Caiman latirostris*. En: Ross, J.P. (Ed.) Crocodiles: status survey and conservation action plan. IUCN- The World conservation Union, IUCN, Gland, Switzerland: 18-20.
- Verdade, L.M. 2000. Regression equations between body and head measurements in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). Revista Brasileira de Biologia 60: 469-482.
- Verdade, L.M. 2001. Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). Brazilian Journal of Biology 61: 431-435.
- Verdade, L.M.; Zucoloto, R.B.; Coutinho, L.L. 2002. Microgeographic variation in *Caiman latirostris*. Journal of Experimental Zoology 294(4): 387-396.
- Villela, P. M. S. 2004. Caracterização genética de populações de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), utilizando marcadores microssatélites. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Waller, T.; Micucci, P. 1993. Relevamiento de la distribución, hábitats y abundancia de los cocodrilidos de la provincia de Corrientes, Argentina. En: Zoocría de los Crocodylia. Memorias de la I Reunión Regional del CSG (Grupo de Especialistas en Cocodrilos de la IUCN): I Taller sobre Zoocría de los Crocodylia, Santa Marta, Colombia. IUCN, Gland, Switzerland: 341-385.
- Wu, B.- X.; Wang, Y.-Q.; Zhou, K.-Y.; Zhu, W.-Q.; Nie, J.-S.; Wang, C.-L.; Xie, W.-S. 2002. Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Biological Conservation 106 (3): 435-441.

- Yan, P. ; Wu, X.B.; Shi, Y.; Gu, C.M.; Wang, R.P.; Wang, C.L. 2005. Identification of chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Conservation* 121 (1): 45-51.
- Yanosky, A.A. 1990. Histoire naturelle du Caiman à museau large (*Caiman latirostris*), un Alligatorinè mal connu. (1). *Revue Francaise d'Aquariologie Herpetologie* 17(1): 19-31.
- Yanosky, A. 1992. Una población de yacarés overos (*Caiman latirostris*) a 800 msnm. Resúmenes del II Congreso Argentino de Herpetología. La Plata, Argentina.
- Zucoloto, R.B., Verdade, L.M.; Coutinho, L.L. 2002. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. *Journal of Experimental Zoology* 294: 346–351.
- Zucoloto, R.B. 2003. Desenvolvimento de seqüências de DNA microssatélite para estudo de populações remanescentes de Jacaré-de-Papo Amarelo (*Caiman latirostris*), da região central do estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Capítulo 2

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA



2.1. Introducción

2.1.1. Análisis de variabilidad

Uno de los principales objetivos de la genética de la conservación es preservar las especies como entidades dinámicas, capaces de evolucionar para adaptarse a los cambios ambientales, y por ello es esencial la comprensión de las fuerzas naturales que determinan los cambios evolutivos. Dicha información es indispensable para el uso sustentable de los recursos naturales. Debido a que la evolución en su nivel más básico es un cambio en la composición genética de una población, ésta sólo ocurre cuando existe diversidad genética. La diversidad genética se refleja en las diferencias entre individuos para diversos caracteres, entre los que se pueden citar los: morfológicos, cromosómicos, proteicos así como los analizados en secuencias de ADN, entre otros. Los genes son secuencias de nucleótidos en un segmento particular (*locus*) de una molécula de ADN. La diversidad genética puede estar representada por secuencias levemente diferentes en un gen. Muchas de esas variantes en una secuencia de ADN resultan en diferencias en las secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por dicho *locus*. Tal variación en una proteína puede resultar en cambios estructurales en la molécula, sin efecto sobre su actividad catalítica (isoenzimas), o bien, provocar disimilitudes morfológicas, bioquímicas o funcionales, que pueden ser causas de diferencias entre individuos, por ejemplo en sus tasas reproductivas, de supervivencia o hasta en sus patrones de comportamiento (Frankham *et al.*, 2002).

El reservorio genético de una población puede caracterizarse a través de las frecuencias de las variantes (alelos) de cada gen, o por medio de índices que reflejan la cantidad de variabilidad genética que alberga dicha población, como la proporción de *loci* polimórficos (P) o el número promedio de alelos por *locus* (A). Otra medida de la variabilidad genética de una población es la heterocigosis media (H), es decir, la proporción de *loci* para los cuales se espera que un individuo de la población sea heterocigota (Hedrick, 2005).

La variación genética existente en una población resulta afectada por un número de factores tales como selección, migración, mutación, deriva genética y el sistema de apareamiento. Estos factores pueden tener efectos particulares: por ejemplo la mutación siempre incrementa la cantidad de variación, y la deriva genética siempre la reduce. Las combinaciones entre dos o más de estos factores pueden generar cantidades o patrones diferentes de variabilidad que resultarán de un balance entre ganancia y pérdida de la misma (Hedrick, 2005). Los valores de variabilidad de una población en un tiempo y espacio determinados la caracterizan, permiten su comparación con otras poblaciones de la misma especie, y representan su capacidad potencial para evolucionar.

Actualmente existen diferentes metodologías para estimar la variabilidad genética, en poblaciones naturales. En este capítulo se utilizan dos diferentes técnicas, una de ellas bioquímica, como es el análisis de isoenzimas y la otra molecular, denominada Amplificación al azar de ADN (RAPD).

2.1.2. Introducción al estudio de las isoenzimas

Las **isoenzimas** o **isozimas** (Markert y Moller, 1959) son diferentes formas moleculares de una enzima que poseen una actividad catalítica común, por lo cual actúan sobre el mismo sustrato (Murphy *et al.*, 1996; Picca *et al.*, 2004). Pueden presentarse en miembros de una misma especie y aún dentro de un mismo tejido, durante las distintas etapas del desarrollo ontogénico. Las isozimas de una proteína dada son codificadas por **genes diferentes**. Las **alozimas** son isozimas codificadas por **alelos de un mismo locus**, es decir que se tratan de variantes alélicas de las isozimas (Prakash *et al.*, 1969).

El análisis de las isoenzimas emplea electroforesis en soportes particulares denominados geles. La electroforesis es la migración diferencial de las moléculas (en este caso, proteínas) en un campo eléctrico, donde la velocidad de desplazamiento depende de la fuerza del campo eléctrico, de la carga neta, del tamaño y forma de la molécula. La carga que caracteriza a cada proteína proviene principalmente de tres

aminoácidos con cadenas laterales positivas (lisina, arginina e histidina) y de dos aminoácidos con cadenas laterales negativas (ácido aspártico y ácido glutámico). La carga neta de una proteína que varía con el pH del *buffer* de la corrida, determina el movimiento de la misma hacia el ánodo (polo positivo) o hacia el cátodo (polo negativo) del gel (Awise, 1994). Ciertas mutaciones en el ADN que codifica a estas enzimas pueden resultar en cambios en la composición de aminoácidos, originando proteínas con diferente carga neta y por lo tanto diferente velocidad de migración. Además, el tamaño y forma de la proteína influyen sobre las propiedades de migración, ya que interactúan con el tamaño del poro de la matriz electroforética o gel. Debido a su bajo costo, seguridad y fácil empleo, el tipo de gel más utilizado es el de almidón, proveniente del almidón de papa hidrolizado; pero debido a que los geles de poliacrilamida tienen en muchos casos mejor resolución, estos son cada vez más utilizados para análisis de isoenzimas. La combinación de la electroforesis y una tinción histoquímica específica hace posible distinguir una enzima particular dentro de un conjunto de varias que migran en ciertas condiciones electroforéticas. Para la tinción se emplean reactivos determinados para cada enzima bajo análisis: el sustrato de la enzima, un cofactor -si es necesario- y una sal oxidada como colorante, que actúan a una temperatura y tiempo determinados, según la actividad de la enzima y el tejido empleado. Luego de la coloración, el gel se revela presentando un precipitado coloreado en forma de bandas. El conjunto de bandas coloreadas que aparecen en el gel luego de la coloración histoquímica recibe el nombre de **zimograma**. En base a la velocidad de migración y al número de bandas para cada enzima, se puede establecer la existencia de diferentes patrones enzimáticos (fenotipos) en los individuos de una población (Murphy *et al.*, 1996). Esta técnica permite: determinar el número de subunidades polipeptídicas que forman la molécula proteica (monómero, multímero), estimar el número de genes involucrados en la producción de una determinada enzima, calcular el número de *loci* polimórficos, estimar el número de alelos por *locus* en una población, y la frecuencia relativa de los mismos, y detectar

interacciones de tipo alélicas y no alélicas. Son varios los aspectos que hacen de la electroforesis de isoenzimas una técnica ventajosa:

- Es un método rápido y relativamente sencillo, que necesita poca cantidad de material para su aplicación.
- Las isoenzimas poseen herencia mendeliana sencilla.
- Estos marcadores son codominantes, pudiéndose distinguir individuos homocigotas de heterocigotas, así las frecuencias alélicas pueden ser calculadas directamente.
- Las estimas de los niveles y distribución de varianza genética pueden ser comparadas directamente entre poblaciones o especies.

Sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas. En líneas generales subestima la variabilidad, pues sólo estudia productos codificados por genes estructurales y no permite analizar regiones no codificantes o regulatorias. Además, no distingue toda la variabilidad genética presente en un determinado locus. Esto es debido a la multiplicidad de codones que pueden codificar un mismo aminoácido, a la variación en las regiones no codificantes del gen, y al hecho de que aproximadamente sólo el 30% de las sustituciones aminoacídicas producen un cambio en la movilidad electroforética de la molécula. Por lo tanto esta técnica no detecta cambios en las proteínas que no involucren un cambio en su carga eléctrica (Avisé, 1994).

No existen antecedentes de la aplicación de la técnica de electroforesis de isoenzimas al estudio de variabilidad genética en *C. latirostris*.

2.1.2.1. Nomenclatura

Siguiendo las normas establecidas por la Unión Internacional de Bioquímica (UIB), los *loci* que controlan la síntesis de las enzimas se designan con las iniciales del nombre de la enzima, con la primera letra en mayúscula. Las isozimas y las alozimas se designan con números y con letras respectivamente en orden decreciente de movilidad hacia el

ánodo (Murphy *et al.*, 1996). Los genotipos se representan con letras minúsculas. Por convención, la banda única de mayor movilidad electroforética representa al genotipo aa, una de menor movilidad será bb y así sucesivamente. Los genotipos heterocigotas se observan en proteínas monoméricas por la presencia de dos bandas de iguales pesos moleculares que las bandas únicas correspondientes a los genotipos homocigotas (Fig. 2.1a).

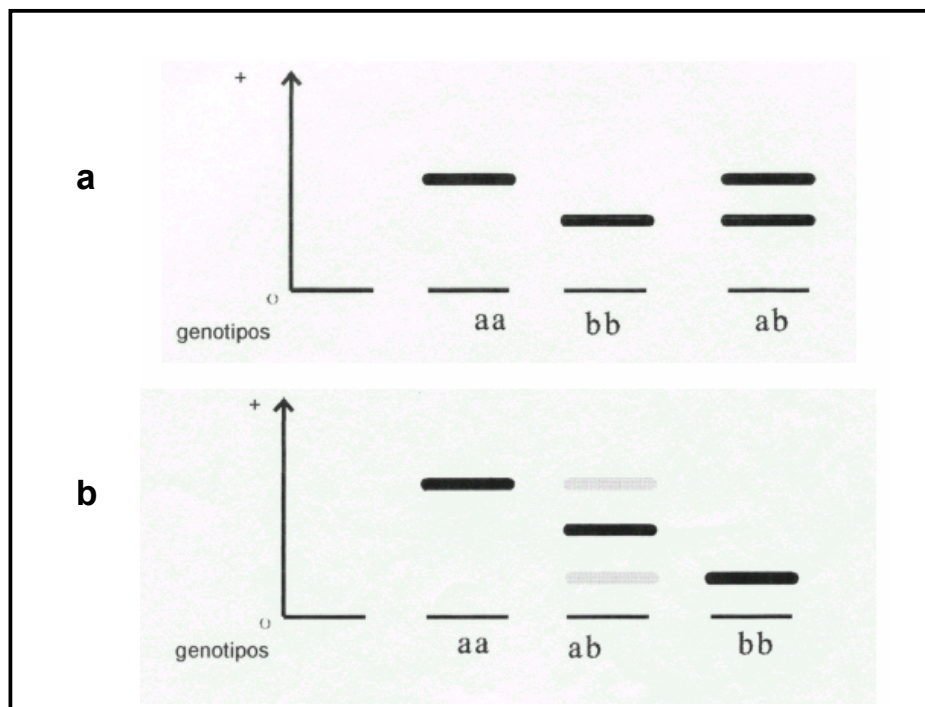


Figura 2.1. Representación esquemática de zimogramas: a) Proteína monomérica (Ej. Esterasa) con dos alelos; b) Proteína dimérica (Ej. Aspartato Amino Transferasa) con dos alelos

En cambio, los genotipos heterocigotas en una proteína dimérica, están representados por una banda oscura de peso intermedio con respecto al peso de las bandas de homocigotas, y dos bandas claras a la altura de las bandas de homocigotas (Fig. 2.1b). La banda oscura en este caso corresponde a la mayoritaria formación de heterodímeros proteicos como resultado de la presencia de dos tipos estructurales enzimáticos, codificados por los dos diferentes alelos (a y b). Las bandas claras, en cambio, representan la formación de cierta cantidad de homodímeros codificados por un mismo alelo (a o b).

2.1.3. Introducción al estudio de los RAPD

La técnica de análisis de RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) es reconocida por su utilidad en los análisis de variabilidad, para revelar gran cantidad de *loci* polimórficos y llevar a cabo exploraciones rápidas del genoma, debido a que posibilita el estudio de muchos *loci* simultáneamente. Esta técnica posee, además, ventajas adicionales: permite la utilización de pequeñas cantidades de ADN genómico y éste puede ser de concentración y pureza moderadas; da la posibilidad de llevar a cabo el procedimiento de análisis sin tener información previa de la secuencia a amplificar; los productos de detección no son radiactivos; y el tiempo de procesamiento de datos generalmente es sencillo y corto (Lynch y Milligan, 1994).

Esta metodología se basa en la reacción de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar segmentos al azar en las muestras bajo análisis. Esta reacción incluye el uso de una ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa), un *buffer* apropiado para la misma, Mg^{2+} como cofactor, desoxirribonucleótidos (dNTPs), un cebador (*primer*) de 10 nucleótidos de secuencia arbitraria, además de una concentración adecuada de la muestra de ADN que se desea analizar. La mezcla de reacción se incuba en un termociclador, equipo que permite programar un ciclo de temperaturas conveniente para efectuar la amplificación de las muestras. Cada ciclo incluye tres etapas: la primera etapa consiste en la desnaturalización (o apertura) de la doble cadena de ADN, que se realiza a 94 °C, la segunda etapa incluye el alineamiento e hibridación del cebador con la secuencia complementaria de la cadena molde de ADN, que se realiza sólo a bajas temperaturas (36 °C aproximadamente). Si dos cebadores se hibridan de manera opuesta en las cadenas de ADN en una distancia amplificable (0.05 a 6 kb), entonces dichas secuencias pueden ser duplicadas. La extensión de las cadenas replicadas se realiza en una tercera etapa, mediante la incorporación de los dNTP complementarios, y se efectúa a 72 °C (Palumbi, 1996). Este ciclo se repite 35 veces para lograr una adecuada concentración de producto amplificado. Estos productos se

analizan por electroforesis en geles y como resultado se obtiene un patrón de bandas para cada individuo y para cada cebador utilizado. Los diferentes patrones ponen en evidencia los polimorfismos en los fragmentos amplificados (Fig. 2. 2).

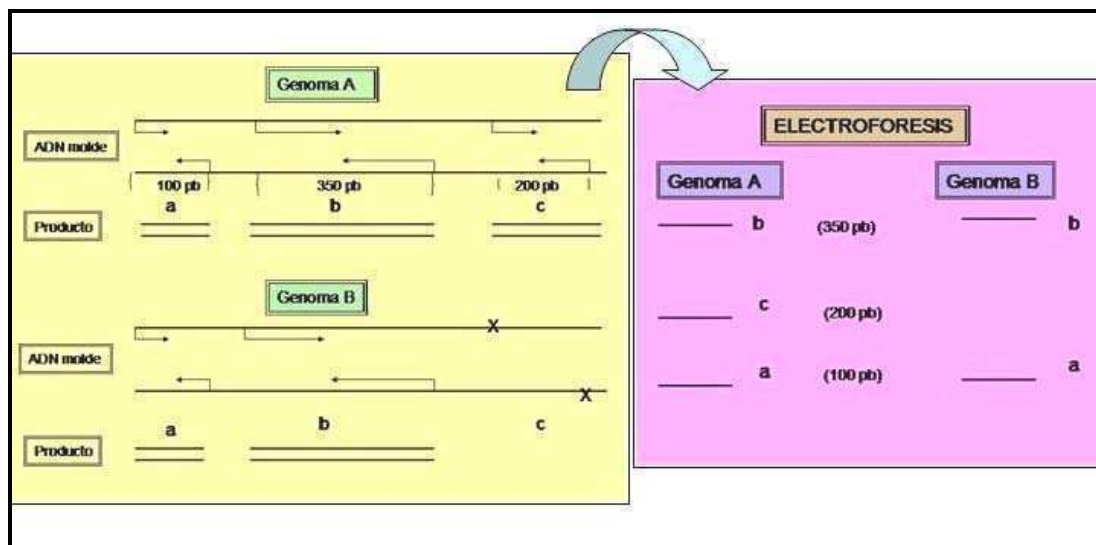


Figura 2.2: Generación y visualización de las bandas de RAPD.

La utilización de cebadores cortos de secuencia arbitraria garantiza con alta probabilidad que estos hibridarán en uno o varios lugares en un genoma determinado, y el análisis de varios cebadores, por lo tanto, posibilita el estudio de muchos *loci* en cada individuo. Si los sitios de hibridado del cebador son polimórficos, entonces la existencia de un producto amplificado particular puede ser utilizada como un carácter mendeliano, el cual es típicamente dominante. En este caso, la frecuencia de este producto en amplificaciones de un gran número de individuos puede ser usada como marcador poblacional.

Otra ventaja de los RAPD es la utilización de cebadores comerciales de secuencia al azar, aplicables al análisis de cualquier especie en estudio. Esto acorta sensiblemente el tiempo invertido en el análisis genético, debido a que una de las principales dificultades de otras técnicas moleculares es el diseño de cebadores específicos que amplifiquen segmentos determinados del ADN, los cuales difieren en su secuencia en diferentes especies.

Sin embargo, se pueden mencionar algunas desventajas de la aplicación de RAPD relacionadas con las dificultades en la repetibilidad de sus resultados. La PCR no siempre es un proceso preciso que produce siempre el mismo resultado. Ocasionalmente, pequeñas diferencias en la calidad o concentración del ADN utilizado en diferentes muestras, pueden causar diferencias artificiales en la detección o no de un producto particular en distintos individuos. Por este motivo, el control estricto de las condiciones de amplificación es crítico en la confiabilidad de los resultados (Palumbi, 1996).

Otra desventaja reside en la dificultad de identificación de *loci* homólogos, lo cual impide la aplicación de esta técnica en comparaciones interespecíficas.

No se han hallado estudios previos de la aplicación de la técnica de RAPD para análisis genéticos en yacaré overo.

2.1.4 Objetivos e Hipótesis

Los Objetivos *particulares* para este capítulo son:

- *Determinar el número probable de loci y alelos por locus en diferentes sistemas isoenzimáticos, investigar la existencia de loci diagnóstico que permitan identificar poblaciones de C. latirostris de la provincia de Santa Fe, y analizar la distribución de la variabilidad genética.*
- *Utilizar la técnica de RAPD para diferenciar poblaciones y estudiar la distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales de C. latirostris de la provincia de Santa Fe.*

La *Hipótesis* a comprobar es:

La presión de caza que ha soportado esta especie y las intensas modificaciones de su hábitat podrían haber generado cuellos de botella poblacionales disminuyendo su tamaño poblacional efectivo, provocando la pérdida de alelos por acción de la deriva genética y la producción de diferencias aleatorias en frecuencias alélicas entre

poblaciones. Por ello se espera encontrar valores bajos de variabilidad en las poblaciones estudiadas.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Estudios de Isoenzimas

2.2.1.1. Obtención de muestras

Se estudiaron 4 sistemas isoenzimáticos en 34 ejemplares de *C. latirostris* provenientes de cuatro poblaciones de la provincia de Santa Fe: “Estancia El Estero” (EEE) -Departamento San Javier ($30^{\circ} 29' S 59^{\circ} 59' W$), “Costa del Salado” (CSA) – Departamento San Cristóbal ($29^{\circ} 58'S 60^{\circ} 50'W$), “Estero del Paraje 114” (EDP)- Departamento San Javier ($30^{\circ} 43'S 60^{\circ} 17'W$), y “Arroyo El Espín” (AES) - Departamento Vera ($29^{\circ} 58'S 60^{\circ} 04' W$) (Fig. 2.3).

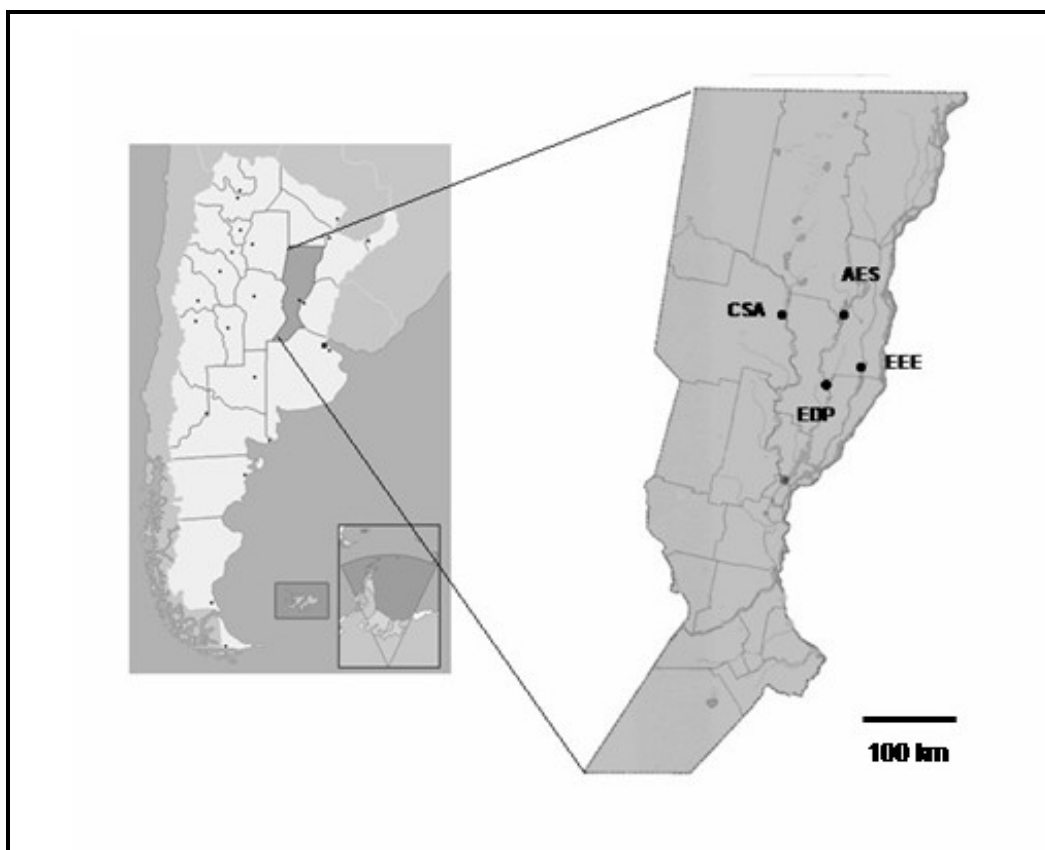


Figura 2.3: Distribución geográfica de las poblaciones muestreadas

El lugar de origen de cada animal fue identificado por medio de marcas que consisten en cortes en las escamas caudales, los cuales simbolizan el año de nacimiento y el número de nido. Todos los individuos utilizados pertenecían al porcentaje de animales destinados a faena como parte de las actividades del Proyecto Yacaré de Santa Fe. Cada ejemplar fue medido, pesado y sexado, y de cada uno se extrajeron porciones de riñón, hígado y corazón. Todas las muestras fueron conservadas en freezer inmediatamente después de su obtención.

2.2.1.2. Análisis de isoenzimas

Para el análisis de isoenzimas, se emplearon geles de almidón de papa hidrolizado al 12,5% en *buffer* TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) pH 8.6 al 10% (Flint *et al.*, 2000). La metodología empleada para la preparación de los geles fue adaptada a partir de la de Murphy *et al.* (1996), e incluye los siguientes pasos: Se calienta el gel hasta ebullición para una completa disolución del almidón en el *buffer*, y luego se retiran las burbujas de aire por medio de una bomba de vacío. Antes de volcar la preparación en el molde, sobre éste se colocan “peines” cubiertos con vaselina para formar las hendiduras de siembra de las muestras. Inmediatamente de volcado el gel caliente en el molde, se cubre con papel autoadherente para evitar la nueva formación de burbujas.

Luego de enfriar los geles una hora a temperatura ambiente y una hora en heladera, se procede a la siembra de las muestras y a la electroforesis correspondiente. Para la preparación de las muestras, de cada individuo se realizó una mezcla de las porciones de tejido (siguiendo el método de Flint *et al.*, 2000), que se homogeneizó en agua destilada estéril, trabajando sobre hielo para evitar la activación de las enzimas. Los homogenatos se centrifugaron por 10 minutos para favorecer la precipitación de los restos celulares y recuperar el sobrenadante que contiene las enzimas hidrosolubles. Las muestras de diferentes individuos, embebidos en papel Watthman, se insertan en las hendiduras del gel. En este trabajo, la siembra de las muestras de cada individuo se realizó por duplicado para obtener una mayor confiabilidad de los resultados. Debido al tamaño de la

cuba disponible, con un molde de 14 cm x 15 cm, se sembraron en cada gel siete muestras duplicadas por vez, es decir un total de catorce muestras por gel. Además, en cada gel, en la última calle se sembró una muestra de colorante (azul de bromofenol) como control de corrida. Para la electroforesis se empleó una cuba horizontal y una fuente de poder de hasta 300 V, y los geles se corrieron a 32 V durante 15 horas a 4 °C. Al finalizar la corrida, los geles se cortaron longitudinalmente en dos o tres capas. Cada capa fue incubada en una solución de revelado para un sistema isoenzimático específico siguiendo los protocolos de Murphy *et al.* (1996).

Los sistemas de isoenzimas a revelar fueron seleccionados debido a su bajo costo y por hallarse datos de análisis previos en trabajos realizados en otros cocodrilianos:

-Superóxido dismutasa (SOD)- E.C.1.15.1.1. Es dimérica o Tetramérica. Ha sido detectada en una amplia serie de organismos y está implicada en el sistema de defensa esencial contra la toxicidad potencial del oxígeno molecular. Comprende una clase de metaloproteína que cataliza la formación de peróxido de H₂. En presencia de luz y PMS, el NBT se convierte en formazán originando un precipitado azul y produciendo oxígeno. La superóxido dismutasa reacciona con el formazán y con el oxígeno liberado, regenerando el NBT. Las zonas donde se produce la reacción se observan como bandas claras sobre el fondo azul intenso.

La solución de revelado empleada incluye: *Buffer* Tris ClH pH 8.5 (50 ml), NBT (0.01 g), NAD (0.0125g), PMS (0.0025 g) y EDTA (pta. de espátula). La preparación se incubaba bajo la luz de una lámpara de 75 W hasta la aparición de bandas claras sobre fondo azul.

-Esterasas (EST)- E.C.3.1.1. Son monoméricas o diméricas. Consisten en enzimas no específicas que hidrolizan uniones ésteres de varios ésteres carboxílicos, y poseen una especificidad de sustrato muy amplia. La solución de tinción puede resolver un número de enzimas con amplia especificidad de sustratos, consideradas hidrolasas éster carboxílicas.

La solución de revelado empleada para α -naftil esterasas, incluye: *Buffer* Tris HCl 0.2M -pH 7.0 (50 ml), solución de α -naftil acetato (3ml) y sal fast blue BB (0.05g). El preparado se incubó a temperatura ambiente hasta observar la aparición de bandas oscuras.

-Isocitrato deshidrogenasa (IDH)- E.C. 1.1.1.42. Es dimérica. Su actividad está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoos, invertebrados y vertebrados. Se trata de una enzima óxido-reductora importante en el metabolismo de los carbohidratos, participante en el ciclo de Krebs.

La solución de revelado (para IDH dependiente de NADP), incluye: *Buffer* Tris HCl 0.2 M pH 7 (50 ml), Solución Cl_2 Mg 0.1M (3 ml), DL-ácido isocítrico (0.08 g), NADP (0.01 g), NBT 5mg/ml (1 ml) y PMS 5mg/ml (1ml). La preparación se incubó a 37 °C hasta comprobar la aparición de bandas violáceas.

-Malato Dehidrogenasa (MDH)- EC 1.1.1.37. Es dimérica. Participa en la biosíntesis de los ácidos grasos catalizando la reducción del oxalacetato a malato.

La solución de revelado, para MDH dependiente de NAD, incluye: *Buffer* Tris HCl 0.2M pH8.0 (50ml), DL-ácido málico 2M (5ml), NAD 10 mg/ml (1ml), NBT 5mg/ml (1ml) y PMS 5mg/ml (1ml). La preparación se incubó a 37 °C hasta comprobar la aparición de bandas de color rosa.

Al finalizar el revelado, cada porción de gel fue conservada en heladera en fijador (metanol-ácido acético-agua).

2.2.2. Análisis de RAPD

2.2.2.1. Obtención de muestras

Los ejemplares fueron muestreados a partir de cuatro poblaciones de la provincia de Santa Fe (Fig. 2.3).

Todos los animales formaban parte de la reserva de ejemplares mantenidos en cautiverio por el Proyecto Yacaré de la ciudad de Santa Fe. Los animales fueron capturados en forma manual y fueron medidos, pesados y sexados. El lugar de origen de cada animal fue identificado por medio de marcas que consisten en cortes en las escamas caudales, los cuales simbolizan el año de nacimiento y el número de nido. Para el análisis de RAPD se utilizaron 40 individuos. De cada una de las cuatro poblaciones estudiadas se analizaron 10 individuos provenientes de diferentes nidos.

Se utilizó sangre entera colectada con EDTA como anticoagulante o diluida en *buffer* de lisis (Longmire *et al.*, 1988) en proporción 1:10, para su conservación a temperatura ambiente de acuerdo con el método de White y Densmore (1992). La sangre fue obtenida por punción de la vena yugular interna a nivel de las vértebras cervicales (Tourn *et al.*, 1993; Zippel *et al.*, 2003), en condiciones de asepsia.

2.2.2.2. Aislamiento y purificación de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Murray y Thompson (1980). Este consiste en tratar la sangre entera con una solución de lisis (*buffer* TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM Na₂EDTA 2 H₂) a temperatura ambiente, realizando 3 lavados, luego tratar con una solución de extracción (2 % (p/-v) CTAB – 1.4 M ClNa- 0.2 % (p/-v) 2-Mercaptoetanol- 20 mM EDTA – 200 mM Tris-HCl pH 7.5) a 60° C durante 3 horas. El material sedimentado es lavado luego en cloroformo, precipitado con alcohol isopropílico e hidratado en 1 ml de agua bidestilada estéril. En las muestras conservadas en *buffer* de lisis se obvió la primera etapa del protocolo de extracción.

Antes de los ensayos de amplificación, se determinó la calidad del ADN de cada muestra y se estimaron las respectivas concentraciones. Para ese fin, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio. Las corridas se realizaron utilizando *buffer* TBE (tris -ácido bórico-EDTA) al 0.5 X a 130 V y 4 W durante 40 minutos. La concentración de ADN fue estimada por

comparación con bandas proporcionadas por el marcador de peso molecular K562 (Promega, Madison, USA) de 10 ng/μl.

2.2.2.3. Evaluación del polimorfismo (RAPD)

2.2.2.3.1. Selección de los cebadores

Como no se conoce *a priori* si el genoma de una especie contiene sitios de unión adecuados para un determinado cebador, se debe evaluar un elevado número de ellos con distintas secuencias, y elegir aquellos con los cuales se obtenga una muy buena amplificación, que generen bandas nítidas, con al menos un *locus* polimórfico por patrón y que las bandas sean repetibles a lo largo de todos los ensayos. Inicialmente, fue analizado un conjunto de 20 cebadores decaméricos al azar (Promega B050-10 y B051-10).

Cada cebador fue probado en 5 individuos incluyéndose siempre un control negativo (con todos los componentes de la reacción excepto el ADN genómico). Esto es fundamental ya que permite determinar si las bandas observadas no son producto de contaminación de los reactivos o de la existencia de ADN foráneo. Debido a que las bandas RAPD son sensibles a las condiciones de amplificación, se pueden originar bandas inespecíficas, lo que implica que ocasionalmente aparezcan o no en el mismo individuo. Por este motivo solamente fueron analizadas aquellas bandas que mostraron ser constantes en los individuos luego de dos ensayos diferentes.

De los 20 cebadores evaluados se seleccionaron 8 teniendo en cuenta la mejor resolución y repetibilidad de las bandas: A01 (CCC AAG GTC C), A02 (GGT GCG GGA A), A03 (AAG ACC CCT C), A05 (CAC CAG GTG A), A06 (GAG TCT CAG G), B04 (TGC CAT CAG T), B05 (GCG CTC ACG C) y B07 (AGA TCG AGC C), con los cuales se amplificaron y analizaron todas las muestras. Estos produjeron un rango de bandas específicas entre 500 y 1200 pb en geles de agarosa.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología de Bardakci y Skibinski (1994), en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM ClK, 2 mM ClMg, 0.01% Gelatina (Promega, Madison, USA), 200 pM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 5 pM del cebador seleccionado, y 1.25 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Promega, Madison, USA) y 25 ng de ADN genómico. En cada reacción se incluyó un control negativo conteniendo todos los reactivos sin incluir ADN. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Watertown, USA) con un programa de 45 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 1 minuto a 36 °C y 2 minutos a 72 °C, con una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

2.2.2.3.2. Análisis de productos amplificados

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% teñidos con bromuro de etidio. Los resultados se documentaron mediante fotografía de los geles bajo transiluminador de luz UV, para su posterior interpretación.

Debido a que las corridas en geles de agarosa revelaron sólo entre 3 y 12 bandas dependiendo del cebador utilizado (Fig. 2.4a y 2.4b), se resolvió aumentar el poder de resolución de los geles utilizados para el análisis de bandas.

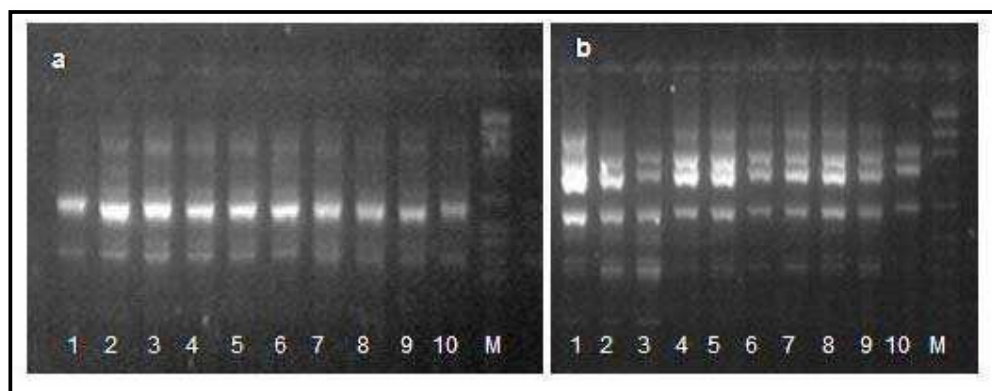


Figura 2. 4: Geles de agarosa visualizados bajo luz UV. a) Calles 1 a 10: muestras de diez individuos de la población CSA amplificadas con el cebador A1; calle M: marcador de tamaño molecular. b) Calles 1 a 10): muestras de diez individuos de la población EDP amplificadas con el cebador B7; calle M: marcador de tamaño molecular.

Con esa finalidad, se inició un análisis de RAPD de alta resolución el cual consiste en resolver los productos amplificados en geles de poliacrilamida, en cubas de secuenciación. La metodología empleada, de Bassam *et al.* (1991), incluye:

-Tratamiento previo de los vidrios: En este trabajo se utilizó una cuba con vidrios de 33 cm x 39 cm. El vidrio repelente se trata con silicona, y el adherente (donde queda adherido el gel) con solución de *bind silane* diluida en etanol-ácido acético.

-Preparación y armado del gel: Se emplearon geles de poliacrilamida al 4%. Para su preparación se utiliza: 40 ml de agua destilada, 3,75 ml de *buffer* TBE 10X y 31,5 g de urea. Esta solución se entibia para favorecer la disolución de la urea. Luego se agrega 7,5 ml de solución de acrilamida: bisacrilamida- 19:1. Esta preparación se conserva en heladera hasta su utilización, y en el momento de su empleo se completa con TEMED y persulfato de amonio (PSA) para lograr la polimerización de la solución de poliacrilamida. La preparación se inyecta entre los vidrios, se colocan los peines, y se deja gelificar durante 12 horas.

-Precorrida del gel: La cuba se arma y en ella se coloca *buffer* TBE 0,5X. Se conecta a una fuente de poder y se realiza una precorrida del gel a 2200 V y 75 W durante 30 minutos.

-Preparación de las muestras por desnaturalización: Las muestras se preparan con partes iguales de *loading buffer* y se desnaturalizan por calor previamente al sembrado de las mismas.

-Sembrado y corrida de las muestras: Luego de desnaturalizadas las muestras son colocadas en hielo para evitar la renaturalización. Se siembran en los orificios del gel y en la primera y última calle se siembra un marcador de peso molecular. La cuba se conecta a la fuente y el gel se corre a 2200 V y 75 W durante 1 hora y media aproximadamente, dependiendo del tamaño de los amplificados que hayan sido sembrados.

-Fijación del gel: Luego de finalizada la corrida, el vidrio con el gel se coloca en una solución de ácido acético al 10% para su fijación.

-Tinción: se empleó una tinción de nitrato de plata al 0,1% que se revela con una solución de carbonato de sodio al 3% con el agregado de tiosulfato y formol. Luego de teñido, el gel se fija finalmente con ácido acético al 10%.

Una vez ajustada esta técnica todos los productos amplificados (analizados previamente en agarosa) fueron corridos en geles de poliacrilamida para comparar los resultados obtenidos en estos dos soportes diferentes. Todos los geles fueron documentados mediante fotografías con cámara digital (Kodak C330) utilizando modo macro, el cual permite un acercamiento del foco de la cámara, sin perder nitidez, para fotografiar las bandas en detalle.

2.2.3. Análisis de datos

2.2.3.1. Datos de isoenzimas

Los zimogramas electroforéticos mostraron el fenotipo de cada individuo para cada una de las proteínas estudiadas. A partir de ellos se infirieron los genotipos de los individuos en cada *locus*, teniendo en cuenta la estructura de las proteínas. En base a esos datos, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas en cada *locus* en cada una de las poblaciones analizadas.

2.2.3.1.1. Índices de variabilidad genética utilizados

Los niveles de variabilidad genética en las poblaciones se cuantificaron por medio de la heterocigosis media esperada (H_e), de la proporción de *loci* polimórficos (P) y del número promedio de alelos (A).

□ Heterocigosis esperada insesgada

La heterocigosis esperada, según el equilibrio de Hardy-Weinberg, para un *locus* simple con n alelos con frecuencias de p_i es:

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

lo cual es uno menos la homocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg, o equivalentemente:

$$H_e = \sum_{i=1}^n p_i (1 - p_i)$$

Esta última forma también es denominada *diversidad genética* (Nei, 1975) y es más utilizado que el de H_o (heterocigosis observada: proporción de heterocigotas observados) debido a que H_e es menos sensible al tamaño muestral. En poblaciones con reproducción al azar estos dos índices son similares (Frankham *et al.*, 2002; Avise, 1994). Este índice es la medida de variación genética más ampliamente estudiada ya que los individuos en una especie diploide son homocigotas o heterocigotas en un *locus* particular, por lo que esta medida representa una cantidad biológicamente útil (Hedrick, 1983). Puede aplicarse utilizando todos los marcadores, ya sean codominantes o dominantes, varía de 0 a 1 y su valor es máximo cuando los alelos tienen frecuencias iguales.

□ **Porcentaje de loci polimórficos**

El polimorfismo genético según Cavalli-Sforza y Bodmer (1971) es la ocurrencia de dos o más alelos en un *locus* en una misma población, cada uno de ellos con frecuencias apreciables. En la práctica, se decide arbitrariamente un límite superior para la frecuencia del alelo más común, típicamente 0.95 ó 0.99. En este trabajo se emplea el criterio de 0.95. Para estimar la proporción de *loci* polimórficos (P) se utiliza:

$$P = \frac{x}{m}$$

donde x representa el número de *loci* polimórficos en una muestra de m *loci*.

Esta medida expresa la proporción de *loci* variables en una población. Además, su cálculo se basa en el conteo directo de *loci* polimórficos y *loci* totales. Puede usarse con

marcadores codominantes, y de manera restrictiva, con marcadores dominantes, debido a que esta estimación presenta una tendencia al sesgo inferior al número real.

□ **Número promedio de alelos por locus**

El número promedio de alelos por *locus* (A), es la suma de todos los alelos detectados en todos los *loci*, dividido por el número total de *loci*:

$$A = (1/k) \sum_{i=1}^k A_i$$

donde k representa al número de *loci* analizados y A_i es el número de alelos detectados por *locus*. Esta medida requiere solamente el conteo del número de alelos por *locus*, y el cálculo de su promedio (Frankham *et al.*, 2002). Brinda información complementaria a la de polimorfismo, y se aplica mejor a marcadores codominantes, dado que los dominantes no permiten la detección de todos los alelos.

2.2.3.2. Datos de RAPD

A través del análisis de todas las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida se construyeron matrices binarias (conteniendo "1" y "0" para asignar presencia y ausencia de bandas, respectivamente, para cada individuo), que fueron analizadas utilizando el programa TFGA (versión 1.3) (Miller, 1998) para calcular estadísticos descriptivos (media, varianza, etc). Primero se analizaron las muestras de los individuos de cada población amplificadas con cada uno de los cebadores, y luego se compararon las poblaciones entre sí.

A partir de la matriz de presencia y ausencia de bandas conteniendo sólo las bandas polimórficas, se calcularon las frecuencias alélicas de cada *locus* en cada población utilizando el programa AFLP-SURV (versión 1.0) (Vekemans, 2002). Para ello se asumieron cuatro supuestos: 1) que cada *locus* puede poseer dos alelos: uno dominante que produce amplificación de la banda, y uno recesivo que no la amplifica; 2) que cada

banda observada es el producto de un único *locus*; 3) que los alelos recesivos de un *locus* son idénticos en estado, es decir, que se originaron en una única mutación; y 4) que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Lynch y Milligan, 1994).

Dado que las bandas de RAPD son marcadores dominantes, las estimaciones de las frecuencias alélicas se realizaron utilizando la ecuación propuesta por Lynch y Milligan (1994):

$$\hat{q} = \sqrt{\hat{x} \left(1 - \frac{\text{Var}(\hat{x})}{8 \hat{x}^2} \right)}$$

donde q es la frecuencia del alelo recesivo y x es la fracción de homocigotas para el alelo recesivo en la población. La frecuencia del alelo dominante se calcula como $p = 1 - q$. Esta fórmula da la estimación insesgada de las frecuencias alélicas para un *locus* con dos alelos que segregan en forma mendeliana dominante.

2.2.3.2.1. Índices de variabilidad genética utilizados

Los niveles de variabilidad genética en las poblaciones se cuantificaron por medio de la heterocigosis media esperada (H_e), de la proporción de *loci* polimórficos (P) y del número promedio de alelos (A) mediante el programa AFLP-SURV (versión 1.0) (Vekemans, 2002).

Además se calculó la significación de las diferencias entre los valores de H_e obtenidos entre poblaciones, aplicando el test de contraste de Friedman por rangos, utilizando el programa STATISTICA (Statsoft Inc., 2007). Esta prueba es una alternativa no paramétrica al análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA), que no posee supuestos con respecto a la distribución de la variable (por ejemplo: normalidad o igualdad de varianzas). Este análisis es útil para comparar variables que fueron medidas en k muestras dependientes y se realiza dividiendo las unidades experimentales en bloques, cada uno de tamaño k , siendo los miembros del bloque tan iguales como sea posible. Luego se le asigna aleatoriamente a las observaciones en cada bloque un rango,

asociando a los rangos observados las medias de los rangos que corresponderían. A continuación se calcula la suma de los rangos asociados con cada uno de los bloques. El estadístico de Friedman se utiliza para comparar las sumas de los rangos observados con el valor esperado, y sigue aproximadamente una distribución χ^2 . Si el valor χ^2 alcanza valores grandes, las diferencias entre las observaciones son grandes. Cuando el valor p para esta prueba es pequeño (usualmente <0.05), la hipótesis nula, que plantea que la distribución es igual a lo largo de todas las medidas, debe ser rechazada (Milton, 2001). Para visualizar los resultados de dicho test, se elaboró un gráfico box-plot, utilizando el mismo programa.

Además de esta comparación múltiple de los valores H_e , se realizó un análisis de comparación de los H_e de a pares, utilizando el test de los rangos de signos de Wilcoxon, utilizando el programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008). Esta prueba es una técnica no paramétrica paralela a la de la t de Student para muestras pareadas, pero no posee supuestos en cuanto a la forma de la distribución de la variable. Utiliza el conjunto de las diferencias entre cada muestra y la mediana hipotética de la distribución de la que se han extraído las muestras. Para aplicar el contraste se considera el conjunto de las diferencias en valor absoluto, ordenadas de menor a mayor, y se les asigna un rango ascendente. A cada rango se le asigna el signo algebraico (+ o -) de la diferencia correspondiente. Si la hipótesis nula es cierta, entonces estas diferencias han sido tomadas de una distribución que es simétrica respecto de cero, y por lo tanto cada rango tiene la misma probabilidad de que se le asigne signo positivo o negativo, y la suma de los rangos positivos y negativos tendrán la misma magnitud. Se utiliza el estadístico W , que es el menor valor resultante seleccionado entre las sumatorias de los rangos positivos y negativos. Cuando el valor p para este test es pequeño (usualmente <0.05), la hipótesis nula debe ser rechazada (Milton, 2001).

2.2.3.2.2. Análisis de estructura poblacional

La estructura poblacional fue analizada mediante el estadístico F_{ST} (Wright, 1951) y además se estimaron los componentes de variabilidad dentro (H_w) y entre poblaciones (H_b), siguiendo el método de Lynch y Milligan (1994) usando AFLP-SURV (versión 1.0) (Vekemans, 2002).

Wright (1951) introdujo un método para describir la estructura genética poblacional de organismos diploides en términos de tres estadísticos F o correlaciones alélicas (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}), cuyas relaciones teóricas son:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST}) (1 - F_{IS})$$

Wright definió F_{IS} como la correlación entre alelos homólogos en individuos de una población local (subpoblación), y F_{IT} como la correspondiente correlación alélica con referencia a la población total. Estos dos índices son llamados frecuentemente **índices de fijación** (F_i). Dado que las bandas de RAPD son marcadores dominantes estos índices F_i no pueden calcularse.

El efecto de la subdivisión de la población se mide por el parámetro F_{ST} , que expresa la reducción promedio en la heterocigosis de una subpoblación debido a la deriva genética por azar. Por tanto,

$$F_{ST} = \frac{H_T - \overline{H_S}}{H_T}$$

H_S = Representa el nivel de heterocigosis que se encontraría en una subpoblación si se dieran cruzamientos al azar, por tanto, H_S es siempre $1 - \sum q_i^2$ para una subpoblación, donde q_i es la frecuencia del alelo i (es la heterocigosis esperada H_e para una subpoblación).

H_T = Representa la heterocigosis que se hallaría si se agruparan todas las subpoblaciones y se dieran cruzamientos al azar en la población total; entonces, si la frecuencia alélica promedio para todas las subpoblaciones es p_0 , el valor de H_T será $2p_0q_0$.

F_{ST} es siempre mayor o igual a cero, debido al efecto Wahlund que asegura que $H_T > H_S$ media. Si todas las subpoblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg con las mismas frecuencias alélicas, entonces $F_{ST} = 0$.

Este estadístico es utilizado comúnmente como una medida de subdivisión poblacional (Frankham *et al.*, 2002) que puede ser aplicado a marcadores dominantes y provee un modo de estimar indirectamente el flujo génico interpoblacional (Nm) (Nei, 1978), en modelos que asumen la neutralidad selectiva:

$$Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$$

F_{ST} mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y por lo tanto, la diferenciación genética entre ellas. Se relaciona con la migración de la siguiente manera: la tasa a la que un alelo se fija en una población es inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población, N_e . (El tamaño efectivo de una población es el número de individuos que darían lugar al coeficiente de endogamia estimado, a la pérdida de heterocigosis calculada o a la varianza estimada en la frecuencia de los alelos, si dichos individuos se reprodujeran de la forma esperada para una población ideal. Para simplificar, generalmente en el cálculo de Nm se utiliza N : número de individuos). Esta tasa de fijación puede ser contrarrestada por el flujo génico que llega de otras poblaciones a una tasa m . Estos factores llegan a un equilibrio en donde F_{ST} es aproximadamente igual a $1/(4Nm + 1)$ para genomas diploides. El valor de Nm expresa entonces el número efectivo de migrantes por generación. Bajo este modelo, de acuerdo con Wright (1969), una tasa de migración mayor a 1 en cada generación es suficiente para contrarrestar la diferenciación debida a deriva genética.

Luego de calcular los estadísticos F_{ST} para pares de poblaciones, se estimaron intervalos de confianza para dichos valores de F_{ST} estimados, utilizando 1000 permutaciones al azar de individuos entre poblaciones utilizando el programa AFLP-SURV (versión 1.0) (Vekemans, 2002).

2.2.3.2.3. Cálculo de distancias genéticas

Se estimaron distancias genéticas entre pares de poblaciones mediante el programa AFLP-SURV (versión 1.0) (Vekemans, 2002), utilizando dos métodos: aplicando los coeficientes F_{ST} estimados de a pares, y calculando distancias genéticas de Nei (1978) entre poblaciones. Esta última medida ayuda a visualizar relaciones entre los grupos que se forman de acuerdo a la distancia que exista entre ellos. Aunque parte de la información se pierde por reducir los datos de frecuencias alélicas a un valor único de distancia, puede haber patrones compartidos entre poblaciones que se pongan en evidencia a través de este índice. Los valores de distancia genética son análogos a las medidas de distancia geométrica, donde 0 equivale a la no existencia de diferencias entre ellas, lo que significa **similitud** (o **identidad**) total. La medida de distancia genética más ampliamente usada es la de Nei.

Para un determinado *locus* con k alelos, si x_i e y_i son las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y, respectivamente, la "**identidad genética**" (similitud) se define como:

$$I = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

donde la sumatoria se establece para todos los alelos. Cuando se consideran los datos de varios *loci*, la identidad (similitud) promedio es:

$$I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

donde J_x , J_y y J_{xy} son, respectivamente, las medias aritméticas de los valores $\sum x_i^2$, $\sum y_i^2$, y $\sum x_i y_i$, calculados para cada uno de los *loci*. El valor de I de Nei tiene un rango desde 0, donde no hay alelos compartidos entre las dos poblaciones, a 1, donde las dos poblaciones tienen idénticas frecuencias alélicas. La distancia genética normalizada de Nei se calcula como $D = -\ln I$, y puede adquirir valores desde 0, para poblaciones con idénticas frecuencias alélicas, hasta infinito, para poblaciones sin alelos compartidos.

A partir de las matrices de distancias calculadas se obtuvieron gráficos donde las unidades de estudio se relacionan en una estructura ramificada jerárquica (fenogramas) para representar relaciones fenéticas relativas, estimadas por el método de agrupamiento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means*), método no ponderado de agrupamiento de pares, que utiliza la media aritmética, (Sneath y Sokal, 1973), usando el programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008). Este método es el más comúnmente empleado y opera de la siguiente manera: en una matriz de distancia se busca la menor distancia existente entre elementos, y las OTU (unidades taxonómicas operativas) involucradas se ligan entre sí a un nodo interno, dibujado en una posición apropiada a lo largo del eje de distancias (Avisé, 1994).

La estructura de las matrices de distancias genéticas y geográficas fue comparada mediante el test de Mantel usando el paquete *ape* (Paradis *et al.*, 2006) del programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008). Este análisis es utilizado para estimar la asociación entre dos matrices de distancias o disimilitud (una de distancias genéticas y la otra de distancias geográficas), simétricas e independientes (Paz, 1998). Se basa en el estadístico z calculado como la suma de los productos cruzados de los elementos de las matrices, excluyendo los elementos de la diagonal. La distribución empírica del estadístico z se obtiene a partir del cálculo sobre todas las permutaciones realizadas (100 en este caso), de los elementos de una de las matrices cuando la otra permanece constante. Al estadístico debidamente estandarizado se le asigna una significación obtenida de la distribución empírica de esas sumas de productos cruzados, que a su vez

se obtiene de confrontar una de las matrices con todas las que resulten de permutar los elementos externos a la diagonal de la otra. Permite identificar si existe relación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas entre las unidades de muestreo analizadas.

2.2.3.2.4. Análisis discriminante de correspondencia

A partir de la matriz binaria construida con las bandas polimórficas de RAPD se realizó un análisis discriminante de correspondencia utilizando el paquete *ade4* del programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008). El análisis discriminante es un método numérico no cladístico dedicado a la búsqueda de discontinuidades naturales entre las unidades de estudio. Tiene por objetivo hallar una o más combinaciones lineales de variables observables que maximicen las diferencias entre grupos. El análisis discriminante de correspondencia en particular constituye el equivalente de componentes principales y coordenadas principales aplicado a variables cualitativas. Es una técnica descriptiva para representar tablas de contingencia, es decir, tablas donde se compilan las frecuencias de aparición de dos o más variables cualitativas en un conjunto de elementos. Se puede interpretar como una manera de representar las variables en un espacio de dimensión menor, de forma análoga a componentes principales, pero definiendo la distancia entre los puntos utilizando la distancia χ^2 en lugar de la distancia euclídea. El objetivo de este análisis es reproducir las distancias entre los puntos en un espacio de pocas dimensiones (Peña, 2002). En este caso, las variables consideradas son la presencia o ausencia de bandas en cada uno de los *loci* polimórficos analizados. Este análisis considera a cada *locus* como una variable que puede representarse como un plano dimensional, por lo cual, la matriz binaria empleada podría resumirse en un espacio de X dimensiones. Para simplificar la información y retenerla en su mayor parte, se calcula el número máximo de ejes dimensionales necesarios para explicar el total de varianza en la muestra. Si las filas y las columnas de la tabla de contingencia son independientes, las entradas en la tabla pueden ser reproducidas

teóricamente, usando los totales de filas y de columnas. En este caso, la hipótesis de independencia implica que todas las bandas tienen la misma probabilidad de aparición en las muestras de todos los individuos. Aplicando el test de χ^2 se calcula cuánto se apartan los valores observados en la tabla de los valores esperados, es decir, cuánto se aparta la distribución real de las bandas de la distribución homogénea esperada, lo que puede interpretarse como una distancia. A la suma de todas las distancias ponderadas por su importancia se la llama **inercia** (valor de χ^2 total). Al descomponer el valor de χ^2 por el número total de observaciones (en este caso, $X \text{ loci} \times N \text{ individuos} = H$), se puede identificar un pequeño número de dimensiones, en las cuales pueden ser representadas las desviaciones de los valores esperados, y se arriba a una representación de menor número de dimensiones que permite reconstruir la mayor parte de la varianza. Para cada una de estas dimensiones o ejes canónicos se calcula luego la “carga” o contribución que produce la información de cada *locus*, y las coordenadas de “ubicación” de cada observación (individuo) en cada eje canónico. Como estadístico auxiliar se estima la **calidad** de la representación de cada punto en el sistema de coordenadas definido por el respectivo número de dimensiones. Los valores de calidad van entre 0 y 1: un valor de baja calidad significa que el número seleccionado de dimensiones no representa bien los datos de la tabla. La calidad de un punto representa la proporción de la contribución de ese punto a la inercia (o χ^2) total que puede ser representado mediante el número de dimensiones elegido. Este valor puede ser interpretado como la correlación entre el punto respectivo y su respectiva dimensión, y es igual al coseno cuadrado del ángulo que el punto marca con la dimensión respectiva. Por lo tanto la calidad total para cada *locus* es igual a la suma de los cosenos al cuadrado de ese *locus* sobre cada eje canónico y da un dato de cuán informativo es ese *locus* para los individuos analizados.

2.3. Resultados

2.3.1. Isoenzimas

El método de extracción de isoenzimas en esta especie pudo ser ajustado con éxito, ya que los cuatro sistemas fueron revelados en todos los individuos analizados. Los geles de almidón revelados para la enzima MDH no pudieron ser fotografiados con nitidez debido a que su conservación en fijador decoloró las bandas obtenidas, por lo cual en estos resultados no se incluyen imágenes de dicho sistema.

La Figura 2.5 muestra geles de almidón revelados para SOD, IDH y Esterasas.

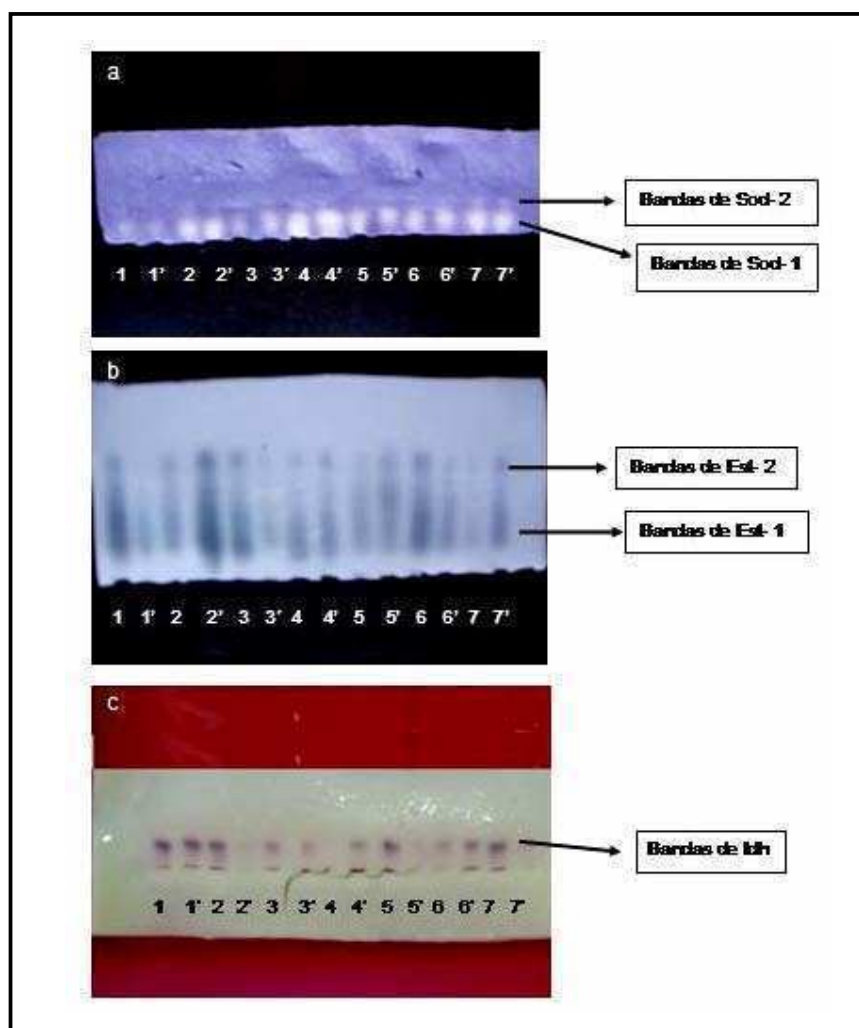


Fig. 2.5: Geles de almidón teñidos para el revelado de SOD (a), EST (b) e IDH (c) en 7 individuos (1 a 7) y sus réplicas (1' a 7').

En algunos geles se observaron diferencias en la concentración de la isoenzima revelada (Fig. 2.5 c), lo cual puede estar indicando diferencias operativas en el preparado de los homogenatos, degradación en algunas de las muestras analizadas o diferencias de regulación en diferentes individuos.

La enzima SOD, mostró un comportamiento disímil a los demás sistemas, ya que la longitud de migración de las muestras fue escasa (Fig. 2.5 a), probablemente debido a su alto peso molecular, y el desplazamiento de dicho sistema fue hacia el cátodo (polo negativo). Este comportamiento posiblemente fue debido a que el pH del *buffer* de migración no haya sido el adecuado.

A partir del análisis de los geles se observó una sola banda por cada *locus* analizado. Esto denota falta de variabilidad genética, debido a que todas las bandas fueron monomórficas y similares para todos los individuos analizados (Tabla 2.1).

Loci y alelos	Población EEE (N=2)	Población CSA (N=11)	Población EDP (N=10)	Población AES (N=11)
Sod-1: frecuencia alelo a	1.00	1.00	1.00	1.00
Sod-2: frecuencia alelo a	1.00	1.00	1.00	1.00
Est-1: frecuencia alelo a	1.00	1.00	1.00	
Est -2: frecuencia alelo a	1.00	1.00	1.00	1.00
Idh: frecuencia alelo a	1.00	1.00	1.00	1.00
Mdh: frecuencia alelo a	1.00	1.00	1.00	1.00
Porcentaje de loci polimórficos (P)	0	0	0	0
Número medio de alelos por locus (A)	1.00	1.00	1.00	1.00
Heterocigosis media observada (H_o)	0	0	0	0

Tabla 2.1: Frecuencias alélicas y estimas de variabilidad (*P*, *A* y *H_o*) obtenidas mediante cuatro sistemas isoenzimáticos en poblaciones santafesinas de *C. latirostris*

Estos datos coinciden con los obtenidos por Gartside *et al.* (1976); Menzies *et al.* (1979); Lawson (1989) y Flint *et al.* (2000) quienes observaron, a partir de estudios isoenzimáticos, altos valores de homocigosis en otras especies de cocodrilianos.

2.3.2. RAPD

2.3.2.1. Calidad del ADN obtenido

El ADN aislado tuvo una concentración promedio de 1.84 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y los extractos se presentaron en estado nativo, no degradados, y fueron de alto peso molecular, como lo demostró la presencia de una única banda en las corridas electroforéticas en agarosa (Fig. 2.6).

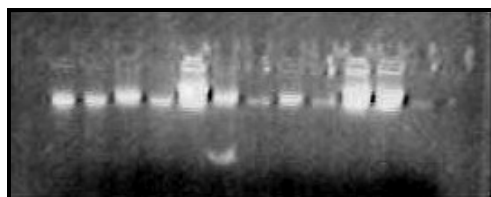


Figura 2.6: Gel de agarosa bajo luz UV donde se sembraron muestras de ADN de 12 individuos. Se puede observar que el ADN, en todos los casos, presenta una banda única, por lo cual se infiere que se presenta en estado nativo.

2.3.2.2. Análisis de variabilidad

Todos los cebadores examinados produjeron diferente patrón de bandas. En geles de agarosa, el número de fragmentos generados por cebador varió entre 3 y 12 bandas, y los productos amplificados mostraron niveles de polimorfismo intrapoblacionales de moderados a bajos ($P =$ de 46.7 a 0 y $H_e =$ de 0.194 a 0). Las diferencias interpoblacionales no fueron claras, probablemente debido a que el número de bandas reveladas en los geles fue escaso.

Al analizar los mismos productos amplificados en geles de poliacrilamida, las corridas revelaron entre 20 y 40 bandas por cebador. Fueron analizados 233 marcadores de los cuales 32 fueron polimórficos y 20 de estos *loci* polimórficos fueron producidos por el cebador B05 (Tabla A, Capítulo 6, Anexo, página 150) (Fig. 2.7).

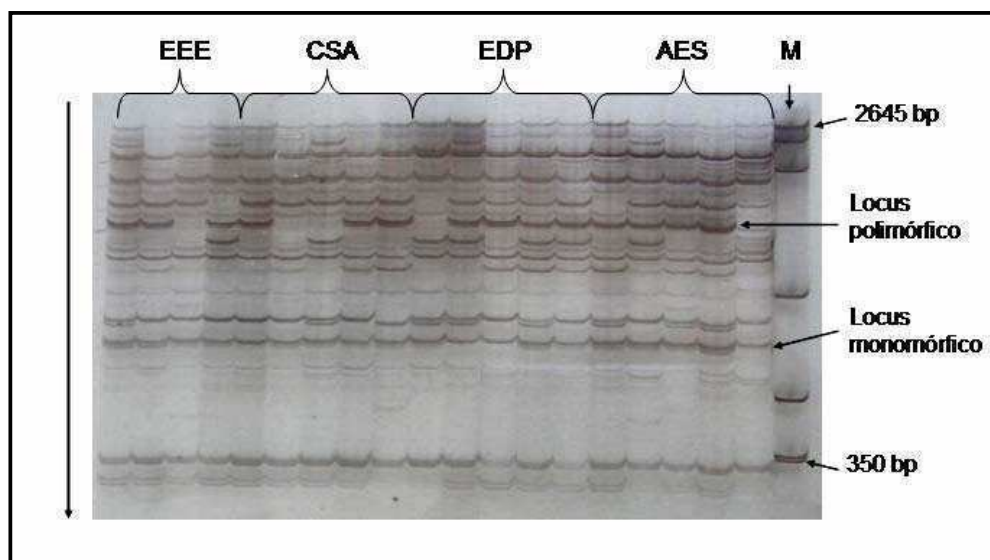


Fig. 2.7. Bandas RAPD amplificadas por el cebador B05, visualizadas en gel de poliacrilamida al 4% teñido con nitrato de plata. EEE, CSA, EDP y AES: productos amplificados de individuos de cada una de las poblaciones analizadas. La flecha vertical a la izquierda muestra la dirección de electroforesis, M: marcador pGem.

Las frecuencias determinadas para cada marcador polimórfico se muestran en la Tabla B del Capítulo 6, Anexo, página 151.

El análisis en geles de poliacrilamida produjo un número relativamente alto de marcadores variables en las poblaciones estudiadas de *C. latirostris* lo que permitió profundizar el estudio de variabilidad.

Los valores de A , P y H_e de cada población obtenidos mediante análisis de bandas en geles de agarosa y de poliacrilamida respectivamente se describen en la Tabla 2.2.

POB	N	A		P		H_e	
		AG	POL	AG	POL	AG	POL.
EEE	10	1.0(0.0)	1.4 (0.1)	3.81	40.6	0.013(0.013)	0.139(0.034)
CSA	10	1.0(0.0)	1.3 (0.1)	0.00	31.3	0 (0.00)	0.130(0.038)
EDP	10	1.3(0.1)	1.4 (0.1)	34.21	40.6	0.140 (0.030)	0.143(0.035)
AES	10	1.5(0.1)	1.7 (0.1)	46.70	65.6	0.194(0.034)	0.242 (0.037)

Tabla 2.2: Valores de A , P y H_e de cada población obtenidos mediante análisis de bandas en geles de agarosa (AG) y de poliacrilamida (POL). POB: poblaciones, N: número muestral.

En la tabla 2.2 se observa que los valores de variabilidad son, en todos los casos, más elevados en el análisis realizado en poliacrilamida que los valores calculados utilizando las bandas reveladas en agarosa.

El análisis de diversidad genética, realizado siguiendo el método de Lynch y Milligan (1994) (ver página 55), mostró que la diversidad genética total (H_T) fue 0.23, siendo la diversidad dentro de poblaciones (H_W) 0.16 ± 0.03 , mientras la diversidad entre poblaciones (H_B) fue 0.06 ± 0.003 . De estos resultados se desprende que la mayor parte de la diversidad genética (73%) se encuentra dentro de las poblaciones, mientras que la diversidad genética entre poblaciones es menor (27%) pero significativa, ya que el intervalo de confianza para H_B no contiene al cero, por lo tanto este valor sería significativo. Estos datos coinciden con los de diferenciación genética, obtenidos mediante la estimación del valor F_{ST} .

El test de comparación múltiple de Friedman dio como resultado diferencias altamente significativas entre los valores de H_e en cada *locus*, ya que el valor de χ^2 fue de 9.317181 con un valor $p= 0.02536$. Estas diferencias están representadas gráficamente en la figura 2.8.

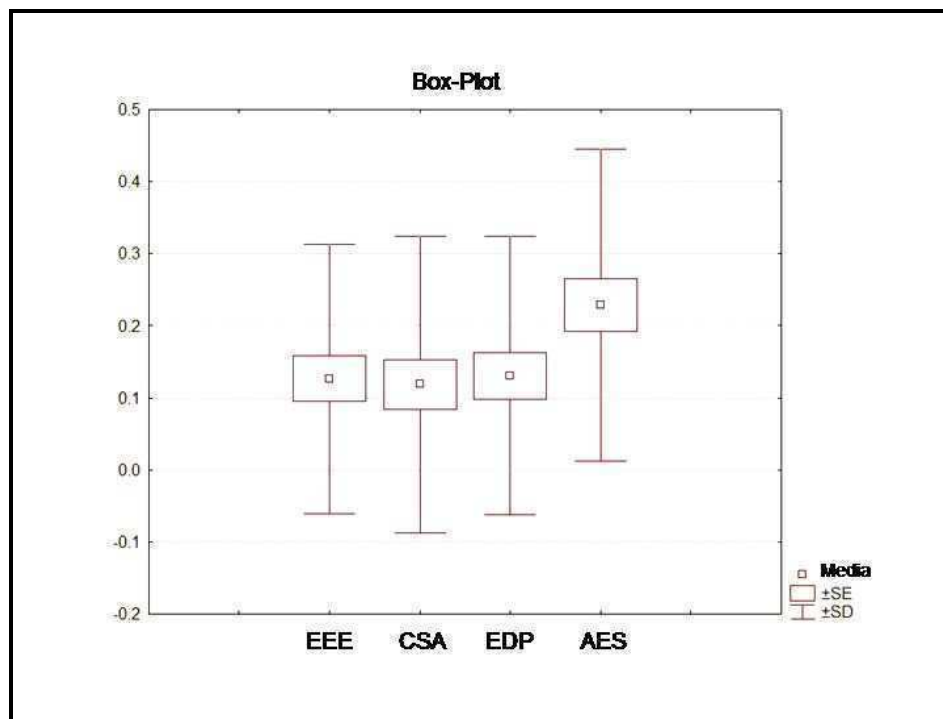


Figura 2.8: Box-plot representando los valores comparativos de H_e en cada *locus* en cada población

Como se nota en esta figura, la población Arroyo El Espín (AES) es la que más se diferencia de las restantes poblaciones, probablemente debido a que, como se observa en la tabla 2.2, AES posee valores de variabilidad mucho más altos que las demás poblaciones.

El test de Wilcoxon realizado para comparar de a pares los valores H_e obtenidos para cada población, arrojó tres comparaciones significativas (Tabla 2.3):

Poblaciones	EEE	CSA	EDP	AES
EEE		$W = 643.5,$ $(p = 0.665)$	$W = 608.5,$ $(p = 0.958)$	$W = 449.5,$ $(p = 0.038^*)$
CSA			$W = 580,$ $(p = 0.650)$	$W = 438.5,$ $(p = 0.023^*)$
EDP				$W = 458,$ $(p = 0.050^*)$

Tabla 2.3: Valores de comparación de a pares de los valores H_e en cada *locus* en cada población. (W: estadístico de Wilcoxon, *: valores significativos)

Como se observa en la Tabla 2.3, la población AES nuevamente se diferencia de modo significativo del resto de las poblaciones analizadas.

2.3.2.3. Análisis de estructura poblacional

El valor F_{ST} (0.27 ± 0.08) fue relativamente alto y altamente significativo ($P < 10^{-4}$ basado en 1000 permutaciones). Consecuentemente, el valor estimado de flujo génico (Nm) fue menor que la unidad (0.3).

El fenograma basado en las distancias genéticas insesgadas de Nei (1978) mostró, consecuentemente al análisis de variabilidad, que la población de Arroyo El Espín está altamente diferenciada del resto (Fig. 2.9). Esto se puede explicar por las grandes diferencias en los parámetros de variabilidad obtenidos en esta población con respecto a las otras poblaciones analizadas.

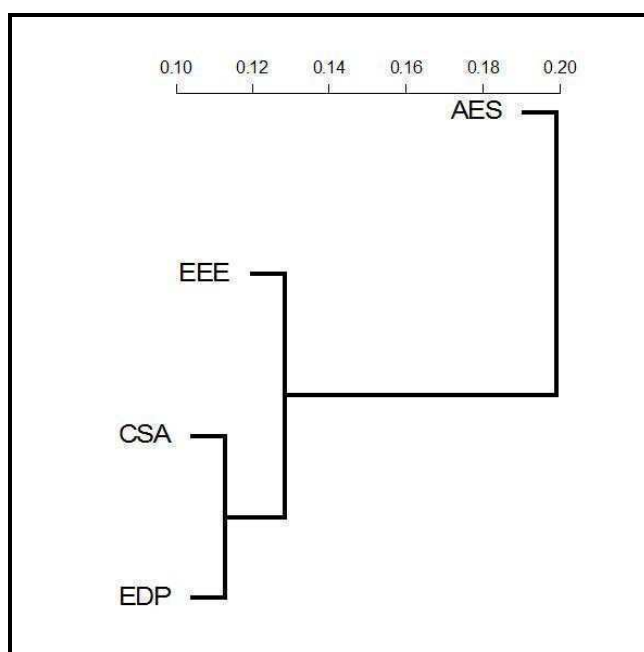


Figura 2.9: Distancias genéticas de Nei (1978) entre las poblaciones analizadas

El soporte *bootstrap* (basado en 1000 remuestreos) para los nodos en el fenograma, elaborado con las distancias de Nei, fue relativamente bajo (< 50%), y el fenograma consenso obtenido a partir de los valores F_{ST} de a pares entre poblaciones (no mostrado) produjo resultados similares, ya que la población AES también se diferenció del resto con altos valores de F_{ST} estimados entre AES y las demás poblaciones (AES- EDP: 0.2418; AES- EEE: 0.2715 y AES- CSA: 0.3019). El resto de las estimas de F_{ST} de a pares también resultaron elevadas, dentro de ese mismo rango de valores, por lo que se podría sugerir que el flujo génico se halla restringido entre todas estas poblaciones.

El test de Mantel basado en 100 permutaciones indicó que las matrices de distancias genéticas y geográficas no están significativamente correlacionadas, ya que los valores obtenidos fueron: $Z=30.31$, $P= 0.61$ para distancias de Nei y $Z= 106.23$, $P= 0.69$ para estimas de a pares de los valores F_{ST} .

El análisis discriminante de correspondencia produjo 15 ejes canónicos que explican el 100% de la varianza total. Luego se seleccionaron los tres ejes más informativos y se calcularon las coordenadas de los individuos para cada uno de ellos (Tabla C, Capítulo 6,

Anexo, página 155). Dado que todos los individuos de cada población poseen las mismas coordenadas, al condensar esta información para cada población, todas las poblaciones resultaron homogéneas y diferentes entre sí. Esto puede observarse en la figura 2.10, donde se utilizaron para la gráfica los dos ejes más informativos, considerando sus autovalores para este lote de datos.

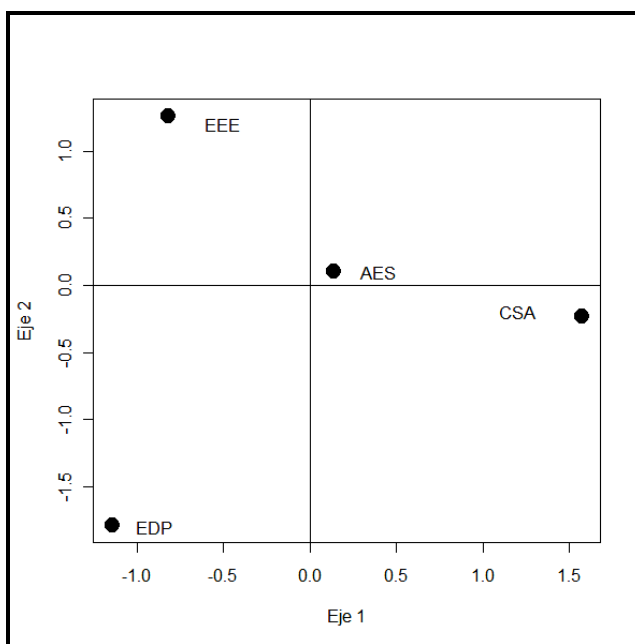


Figura 2.10: Representación de las coordenadas de las cuatro poblaciones sobre los ejes más informativos, como resultado del análisis discriminante de correspondencia

Esta figura coincidió con el gráfico resultante de las coordenadas individuales, dado que las coordenadas de los individuos de cada población coinciden en un mismo punto con la coordenada promedio para cada población. Como se observa en dicha figura, todas las poblaciones analizadas aparecen bien separadas y nuevamente la población AES es la más diferente del resto.

Además se calculó el “peso” de cada banda sobre cada eje (Tabla D, Capítulo 6, Anexo, página 156), así como los cosenos entre los *loci* y los ejes canónicos para el cálculo de la calidad (Tabla E, Capítulo 6, Anexo, página 157). Los *loci* con mayor calidad fueron A1-12, A1-17 y B5-35 con valores mayores a 0,87. Esto significa que estos *loci*

contribuyen muy bien a la separación de las poblaciones. Al analizar la matriz binaria (Tabla A, Capítulo 6, Anexo, página 150), en particular los marcadores A1-12 y A1-17 aparecen como exclusivos de la población AES, y B5-35 aparece de modo exclusivo en las poblaciones EEE y CSA.

2.4. Conclusiones generales del Capítulo

- Los objetivos particulares fueron alcanzados ya que se logró analizar la variabilidad genética poblacional mediante métodos isoenzimáticos y con marcadores RAPD.
- Ninguno de los sistemas isoenzimáticos analizados reveló bandas diagnósticas que permitan el reconocimiento de las diferentes poblaciones, siendo todos los *loci* monomórficos en todas las poblaciones estudiadas.
- La ausencia de variabilidad isoenzimática coincide con estudios de otros autores realizados en otros cocodrilianos.
- Mediante la técnica de RAPD se logró diferenciar poblaciones y estudiar la distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales de *C. latirostris* de la provincia de Santa Fe.
- Los valores de variabilidad estimados a partir de RAPD utilizando geles de poliacrilamida fueron de bajos a moderados. Estos datos apoyarían la hipótesis planteada donde se esperaba encontrar baja variabilidad genética, debido a una reducción drástica poblacional e intensa modificación del hábitat.
- Se hallaron diferencias entre poblaciones debido a la presencia de algunos *loci*, que podrían considerarse diagnósticos para las poblaciones analizadas. En particular, AES se diferencia del resto, con valores de variabilidad mucho más altos y dos *loci* diagnósticos.

- Los niveles de flujo génico fueron bajos y la diferenciación hallada entre poblaciones fue significativa.
- La diferenciación entre poblaciones es compatible con la hipótesis de la ocurrencia de cuellos de botella y deriva genética.
- Debido a que no se halló correlación significativa entre las matrices de distancia genética y geográfica, se puede predecir que no se alcanzó el equilibrio entre migración, mutación y deriva genética entre estas poblaciones.

2.5. Bibliografía citada

- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, USA.
- Bardakci, F.; Skibinski, O. F. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117 – 123.
- Bassam, B.J.; Caetano- Anolles, G.; Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196:80-83.
- Cavalli –Sforza, L.L.; Bodmer, W.F. 1971. The Genetics of Human Populations. Freeman, San Francisco, USA.
- Flint, N. S.; van der Bank, F. H.; Grobler, J. P. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water S.A.* 26: 105-109.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gartside, D.F.; Dessauer, H.C.; Joanen, T. 1976. Genic homozygosity in an ancient reptile (*Alligator mississippiensis*). *Biochemical Genetics*, 15 (7/8): 655-663.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics of populations. Science books international, Boston, USA.
- Hedrick, P.W. 2005. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, USA.

- Lawson, R.; Kofron, C.P.; Dessauer, H.C. 1989. Allozyme variation in a natural population of the Nile Crocodile. *American Zoologist* 29: 863-871.
- Longmire, J.L.; Lewis, A.K.; Brown, N.C.; Buckingham, J.M.; Clark, L.M.; Jones, M.D.; Meincke, L.J.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Ray, F.A.; Wagner, R.P.; Moyzis, R.K. 1988. Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. *Genomics* 2: 14-24.
- Lynch, M.; Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Markert, C.L.; Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 45: 753-763.
- Menzies, R.A.; Kushlan, J.; Dessauer, H.C. 1979. Low degree of genetic variability in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Isozyme Bulletin* 12: 61.
- Miller, M.P. 1998. A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-marker raw data. Department of Biological Sciences- Box 5640 Northern Arizona University Flagstaff, AZ 86011-5640. mpm2@nauvax.ucc.nau.edu.
- Milton, J.S. 2001. *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. 3era. Edición. Mc. Graw Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Murphy, R. W.; Sites, J.W.; Buth, D.G.; Haufler, C.H. 1996. Proteins: Isozyme electrophoresis. En: Hillis, D.M.; Moritz, C; Mable, B.K. (Eds.). *Molecular Systematics*. 2nd Edition, Sinauer Associates Press, Sunderland, Massachusetts, USA: 51-120.
- Murray, M. G.; Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Nei, M. 1975. *Molecular Population genetics and Evolution*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 83: 583-590.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic Acids II: The polymerase Chain Reaction. En: D.M. Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B.K. (Eds.). *Molecular Systematics*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA: 205-248.
- Paradis, E.; Strimmer, K.; Claude, J.; Jobb, G.; Opgen-Rhein, R.; Dutheil, J.; Noel, Y.; Bolker, B.; Lemon, J. 2006. The ape Package. <http://www.r-project.org>.
- Paz, J. 1998. Manual de Bioestadística. Ed. Instituto Universitario CEMIC (Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno-Hospital Asociado Facultad de Medicina). Buenos Aires, Argentina.
- Peña, D. 2002. Análisis de datos multivariantes. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana, Madrid, España.
- Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N.; Carrera, C. 2004. Marcadores moleculares. En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. (Eds.). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Ed. INTA, Buenos Aires, Argentina: 61-68.
- Prakash, S.; Lewontin, R.C; Hubby, J.L.1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variations in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* 61: 841-858.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
- Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, California, USA.
- StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA 8.0 for Windows (www.statsoft.com).
- Tourn, S.; Imhof, A.; Costa, A.L.; von Finck, M.C.; Larriera, A. 1993. Colecta de sangre y procesamiento de muestras en *Caiman latirostris* (Informe de avance). En: Larriera, A.; Imhof, A.; von Finck, M.C.; Costa, A.L.; Tourn, S.C. (Eds.). *Memorias*

del IV Workshop sobre Conservación y Manejo del Yacaré Overo (*Caiman latirostris*). Santa Fe. Argentina. La Región, Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina.

Vekemans, X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Diffusé par l'auteur. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

White, P. S.; Densmore, L.D. 1992. Mitochondrial DNA isolation. En: Hoelzel, A.R. (Ed.). Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK: 29-57.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.

Wright, S. 1969. *Evolution and Genetics of Populations. The theory of gene frequencies*, Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago.

Zippel, K.C.; Lillywhite, H.B.; Mladinich, C.R.J. 2003. Anatomy of the crocodylian spinal vein, *Journal of Morphology* 258: 327–335.

Capítulo 3

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD FENOTÍPICA



3.1. Introducción

3.1.1. Análisis de caracteres morfológicos

La base genética de la variación morfológica es un tema fundamental para la biología evolutiva. La existencia de variación fenotípica asociada a componentes de la eficacia biológica es la premisa necesaria para que pueda ocurrir selección natural, y si dicha variación tiene una base genética los efectos de la selección tendrán efectos sobre las siguientes generaciones (Endler, 1986).

Los caracteres morfológicos han sido analizados desde que los griegos y los romanos comenzaron a describir variedades de plantas y animales, para establecer diferencias y similitudes entre ellos. La clasificación de seres vivos por semejanzas estructurales fue establecida sobre bases sistemáticas firmes por el biólogo sueco Carl von Linné (Linneo) en el siglo XVIII, quien utilizó un método de clasificación donde agrupaba a individuos de morfología relacionada en especies, y en función de sus diferencias, en grupos jerárquicos de nivel superior. A partir de ese momento, muchas especies fueron descritas en función de la similitud morfológica de los ejemplares que las integraban. Es así como el estudio de la morfología ha contribuido extensamente para la real comprensión de las estructuras de los organismos y las relaciones entre ellos (Villée, 1996).

Estos caracteres poseen varias ventajas: son fáciles de observar, requieren técnicas e instrumentos sencillos para su medición, pueden ser estudiados en cualquier tipo de organismo y estadio de vida, y poseen bajos costos para su estudio. A pesar de ello, poseen la desventaja de que los caracteres morfológicos independientes son finitos y escasos en relación con la adición de nuevos taxones para análisis. En general, para realizar estudios de variación de caracteres morfológicos es necesario que los rasgos bajo análisis no estén correlacionados entre sí y se deben excluir aquellos que resulten redundantes (Crisci y López Armengol, 1983).

Otra limitación es la influencia del ambiente en la relación genotipo- fenotipo. A diferencia de los caracteres moleculares, los cuales en su mayoría son neutros, los caracteres de morfología externa son adaptativos y están muy influenciados por el ambiente.

3.1.2. Aplicaciones de la morfometría

El propósito de la morfometría es cuantificar el tamaño y la forma de los seres vivos. Ambas son importantes propiedades biológicas de los organismos, derivadas de sus bases genéticas, en compleja asociación y en interacción con el ambiente externo e interno, con importantes implicancias funcionales y ecológicas (Marroig, 2007). Una variedad de procesos biológicos producen diferencias en la forma entre individuos o sus partes, tales como enfermedades o injurias, desarrollo ontogenético, adaptación a factores geográficos locales o diversificación evolutiva a lo largo del tiempo. Las diferencias en la forma pueden ser señal de la existencia de roles funcionales diferentes llevadas a cabo por las mismas partes, diferentes respuestas a las mismas presiones de selección (o diferencias en las presiones selectivas), tanto como diferencias en procesos de crecimiento y morfogénesis. El análisis de la forma es un intento de comprensión de las diversas causas de variación y de transformación morfológica (Zelditch *et al.*, 2004).

Los estudios morfométricos usualmente producen como resultado tablas con listas de números que representan mediciones obtenidas de los ejemplares. Estos números son abstractos, y no permiten visualizarlos como descriptores de diferencias de forma. Debido a su lenguaje matemático y abstracto, la morfometría se encuentra mucho más cercana a la estadística y al álgebra que a la morfología. La matemática le provee el modelo usado para análisis de datos, incluyendo los modelos lineales generales utilizados en análisis estadísticos y los modelos exploratorios, tales como componentes principales. Adicionalmente, la matemática provee una teoría de la medida que se utiliza para obtener los datos (Zelditch *et al.*, 2004). Actualmente, la aplicación de técnicas numéricas

multivariadas permiten obtener rigurosidad estadística al estudiar caracteres morfométricos, ya que permiten analizar simultáneamente numerosas variables y en base a ellas establecer relaciones de similitud global o fenéticas entre las unidades de estudio (Sneath y Sokal, 1973; Sokal, 1986).

Estos métodos de análisis se utilizan particularmente en estudios de crecimiento y evolución (Klingenberg, 1996) y también en estudios de variación morfológica con base genética (Cheverud *et al.*, 1997; Leamy *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1999).

Usualmente una gran fracción de la variabilidad de los datos morfométricos es debida a la variación entre individuos. Algunas veces, los efectos de ampliación en una medida morfométrica pueden resultar en cambios en la forma del rasgo, debido a las relaciones alométricas entre rasgos, a menos que todos los componentes morfométricos crezcan a la misma tasa (isometría) (Bookstein *et al.*, 1979; Somers, 1986; Rohlf y Bookstein, 1987; Lleonart *et al.*, 2000).

La variabilidad o su ausencia en los rasgos pueden tomarse como evidencia de desarrollo o de limitación respectivamente, mientras que la covariación de rasgos sugiere integración o interdependencia causal (Olson y Miller, 1958). Los rasgos que se encuentran relacionados en cuanto a su función y su desarrollo, evolucionan juntos (al menos, teóricamente) para dar lugar a correlaciones genéticas congruentes con relaciones funcionales y de desarrollo. En los casos donde la selección favorece la integración de caracteres fenotípicos se espera que este agente también favorezca la integración pleiotrópica (a nivel individual) y genética (evaluada en el marco de la genética cuantitativa), resultando una respuesta coordinada a la selección. Además, esta integración morfológica facilita la evolución adaptativa (Lande, 1979; Riska, 1986).

3.1.3. Estudios morfométricos en caimanes

En relación con el análisis de medidas morfométricas en *C. latirostris* se pueden citar trabajos de Verdade (1997, 2000, 2001), quien analizó 4 medidas del tamaño del cuerpo

y 14 de la cabeza así como 10 medidas relativas (proporciones entre medidas absolutas) a diferentes edades. El autor concluyó que todas las variables dependientes de la edad son también dependientes del tamaño, y consecuentemente dependientes de la tasa de crecimiento. A su vez, detectó dimorfismo sexual en el crecimiento alométrico del cráneo. Además, el autor relacionó medidas morfométricas de hembras con medidas de sus nidadas encontrando correlación significativa entre varias de estas medidas. Monteiro *et al.* (1997) analizaron comparativamente, los cambios ontogenéticos en la forma del cráneo de *C. latirostris* junto a otros dos caimanes, y concluyeron que las diferencias en los procesos ontogenéticos probablemente causan diferencias dietarias entre *C. latirostris* y las otras dos especies. Existen otros autores que realizaron análisis similares aplicados a otras especies de cocodrilianos tales como Montague (1984), Miranda *et al.* (2002), e Isberg *et al.* (2004).

En relación con los antecedentes de estudios morfométricos en *C. latirostris*, no se hallaron trabajos previos acerca de análisis específicos de variabilidad fenotípica poblacional en caracteres cuantitativos para esta especie.

3.1.4. Objetivos e Hipótesis

Los Objetivos particulares para este capítulo fueron:

- *Analizar la variación fenotípica de rasgos cuantitativos en poblaciones naturales de C. latirostris en la provincia de Santa Fe.*
- *Estimar valores de heredabilidad para rasgos de importancia económica y adaptativa en C. latirostris.*

Las *Hipótesis* a comprobar son:

- Debido a que estudios previos realizados en otros cocodrilianos demostraron una gran estabilidad de sus fenotipos a través del tiempo, se espera encontrar

bajos valores de variabilidad fenotípica en los caracteres morfométricos analizados en *C. latirostris*.

- Los rasgos sometidos a selección natural intensa en general poseen baja heredabilidad ya que las poblaciones no toleran la presencia de variantes perjudiciales en alta frecuencia, y los desvíos con respecto al fenotipo óptimo son rápidamente eliminados por selección normalizadora. Si la morfología en esta especie es un rasgo sujeto a selección intensa, se espera hallar valores bajos de heredabilidad en los caracteres analizados en *C. latirostris*.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Obtención de datos

Se analizaron cuatro poblaciones de la provincia de Santa Fe (EEE, CSA, EDP y AES (Fig. 2.3, Capítulo 2, página 42). De cada población se seleccionaron al azar cuatro nidos, y de cada uno de ellos se midieron 10 pichones seleccionados al azar. Esto constituyó un total de 160 ejemplares (4 poblaciones x 4 nidos x 10 individuos). Los ejemplares fueron medidos dentro de las 48 horas de nacidos. De cada animal se registró la fecha de nacimiento, el número de nido y la población de origen. El sexo en los recién nacidos no puede ser detectado sin sacrificar a los animales; por ese motivo, no se tuvo en cuenta el efecto del sexo en el presente estudio.

En todos los animales se obtuvieron 11 medidas morfométricas (Verdade, 2001), (Fig. 3.1). La descripción de cada una de las medidas representadas en la figura 3.1 se resume en la Tabla 3.1.

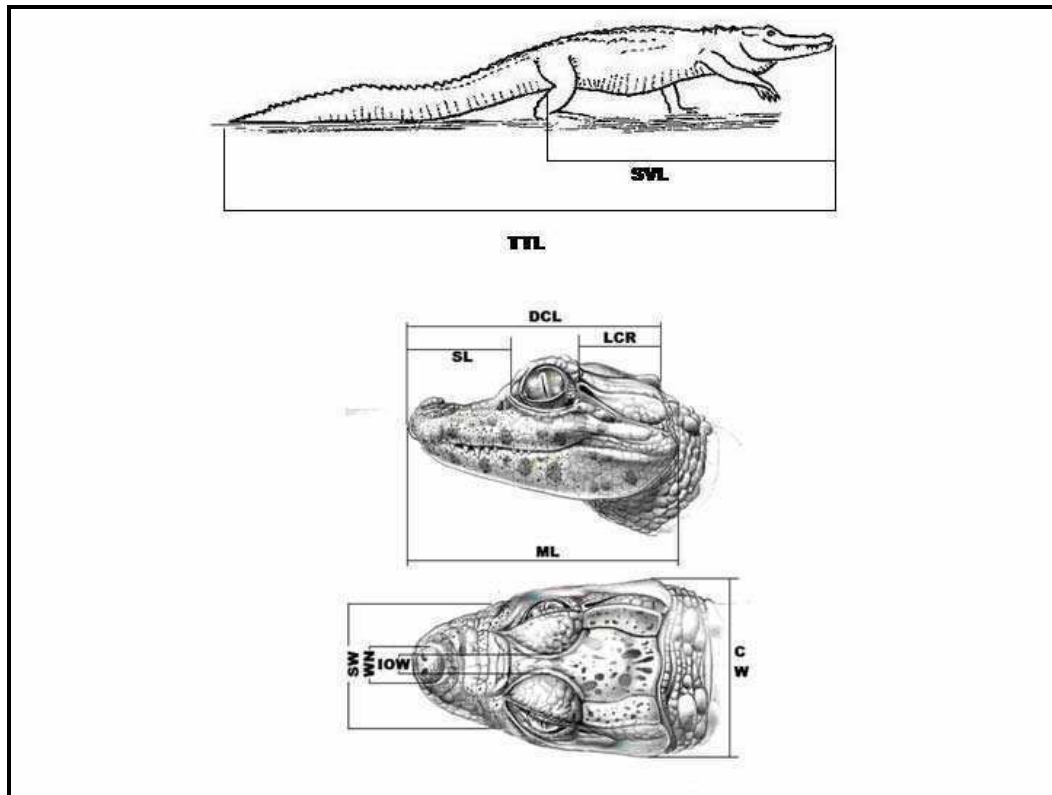


Figura 3.1: Medidas morfométricas obtenidas en ejemplares recién nacidos de *Caiman latirostris* (adaptadas a partir del trabajo de Verdade, 2001).

Abreviatura	Descripción
TTL	Largo total: desde el extremo anterior del hocico hasta el extremo posterior de la cola.
SVL	Largo desde el extremo anterior del hocico hasta el inicio anterior de la abertura de la cloaca.
DCL	Largo dorso-craneal: desde el extremo anterior del hocico a la superficie posterior del cóndilo occipital.
SL	Largo del hocico: desde el extremo anterior del hocico al borde orbital anterior, medido diagonalmente.
LCR	Largo del techo craneal postorbital: distancia desde el borde orbital posterior al borde posterolateral del escamoso.
CW	Ancho craneal: distancia entre las superficies laterales de los cóndilos mandibulares de los cuadrados.
SW	Ancho de la base del hocico: ancho a través de los bordes orbitales anteriores.
WN	Ancho máximo entre las narinas externas.
IOW	Ancho mínimo interorbital.
ML	Largo de la mandíbula: extremo anterior del dentario al extremo posterior del proceso retroarticular.
BM	Masa corporal (peso)

Tabla 3.1: Descripción de las medidas morfométricas obtenidas en ejemplares recién nacidos de *Caiman latirostris* (adaptadas a partir del trabajo de Verdade, 2001).

Los rasgos corporales TTL y SVL fueron medidos con una precisión de 1 milímetro usando una regla milimetrada. Los rasgos de la cabeza fueron medidos con una precisión de 0.01 mm utilizando un calibre digital electrónico Vernier. El peso fue registrado utilizando una balanza Ohaus CS 200 con una precisión de 0.1 g.

3.2.2. Análisis de varianza

Se utilizó el programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008) para realizar un análisis descriptivo (cálculo de media y desvío *standard*) de todas las variables. Para realizar análisis morfométricos se prefiere utilizar medidas de varianza y desvíos *standard*, debido a la posibilidad de dividir la varianza en sus componentes. El análisis de la varianza (denominado ANOVA) hace referencia a un procedimiento analítico por el que se subdivide la variación total en la magnitud de una determinada respuesta, en componentes que pueden atribuirse a algún origen reconocible, y utilizarse para contrastar hipótesis de interés (Milton, 2001).

En este trabajo, el análisis de distribución de la variación en los rasgos cuantitativos siguió un modelo factorial, es decir, de más de un factor (nidos y poblaciones). Los modelos factoriales de análisis de varianza sirven para evaluar el efecto individual y conjunto de dos o más factores (variables independientes categóricas) sobre una variable dependiente cuantitativa. En un análisis de varianza factorial existe una hipótesis nula por cada factor y por cada combinación de factores. La hipótesis nula referida a un factor afirma que las medias de las poblaciones definidas por los niveles del factor son iguales. La hipótesis referida al efecto de una interacción entre factores afirma que tal efecto es nulo. Para cada una de estas hipótesis existe un estadístico *F* que permite contrastarla. El valor de este estadístico se calcula mediante el siguiente procedimiento (adaptado de Milton, 2001):

El análisis de la varianza se definió como un método por medio del cual la variación total en algunas respuestas medidas se subdivide en componentes que pueden atribuirse

a orígenes reconocibles. En la práctica, para subdividir la varianza, las medias teóricas se reemplazan por sus estimadores $\bar{X}_1, \bar{X}_2, \dots, \bar{X}_k$ respectivamente. Teniendo en cuenta la variación en todos los componentes de la muestra, se calculan los desvíos respecto de la media en cada componente de las observaciones, y se eleva estos desvíos al cuadrado:

$$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x})^2 = n \sum_{j=1}^k (\bar{x}_j - \bar{x})^2 + \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

Siendo:

$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x})^2$ = la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones respecto a la media global. Representa la medida de la variabilidad total en los datos, se lo denomina *suma total de cuadrados* (SC_{Total}).

$n \sum_{j=1}^k (\bar{x}_j - \bar{x})^2$ = la suma ponderada de los cuadrados de las desviaciones del nivel o de las medias de los tratamientos respecto de la media global. Es una medida de la variabilidad en los datos atribuida al hecho de que se utilicen diferentes niveles o tratamientos. Se lo denomina *suma de cuadrados de los tratamientos* (SC_{Tr}).

$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$ = la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones respecto de la media de los tratamientos asociada con la observación. Es una medida de la variabilidad en los datos atribuida a las fluctuaciones aleatorias entre sujetos dentro del mismo nivel del factor. Se lo denomina *suma de los cuadrados de los residuos, o error* (SC_E).

Entonces, se puede escribir la suma de cuadrados como: $SC_{Total} = SC_{Tr} + SC_E$.

Para contrastar la hipótesis nula (H_0) se necesita definir estadísticos que sean funciones de SC_{Tr} y SC_E . El primero, llamado *cuadrado medio de los tratamientos* (CM_{Tr}) se halla dividiendo SC_{Tr} por $k-1$; el segundo, llamado *cuadrado medio del error* (CM_E) se

halla dividiendo SC_E por $N - k$, donde N es el número de observaciones dentro de cada tratamiento, y k es el número de tratamientos.

Entonces, si H_0 es cierta, se espera que CM_{Tr} y CM_E tengan valores próximos, ya que ambos estiman el mismo parámetro, la varianza. Si H_0 no es cierta, se espera que CM_{Tr} sea algo mayor que CM_E , lo que sugiere al cociente CM_{Tr} / CM_E como un estadístico lógico. Si H_0 es cierta, su valor será próximo a 1, sino deberá tomar un valor mayor. El cociente se utiliza como estadístico de contraste, ya que se sabe que tiene una distribución F con $k-1$ y $N-k$ grados de libertad:

$$F_{k-1, N-k} = \frac{CM_{Tr}}{CM_E}$$

Para el análisis de varianza en este trabajo, se aplicó un diseño jerárquico o anidado, ya que uno de los factores (nido) está incluido o “anidado” en el otro factor (población). Esto significa que los niveles de uno de los factores son distintos en cada nivel del otro factor. Para estimar los componentes de varianza a los diferentes niveles jerárquicos se usó el paquete *lme4* del programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008). Se realizó un análisis de ANOVA y una extensión de este test, el MANOVA (Análisis Multivariado de Varianza), el cual se utiliza para cubrir los casos donde hay más de una variable dependiente que no pueden ser combinadas de manera simple. Además de identificar si los cambios en las variables independientes tienen efectos significativos en las variables dependientes, esta técnica también intenta identificar las interacciones entre las variables independientes y su grado de asociación con las dependientes.

Durante el desarrollo de estas pruebas, los nidos y las poblaciones fueron considerados factores aleatorios: un factor de efectos aleatorios es aquel cuyos niveles son seleccionados de forma aleatoria entre todos los posibles niveles del factor, es decir que los niveles concretos que toma un factor de efectos aleatorios constituyen sólo una muestra de la población de niveles (nidos y poblaciones) sobre los que se hace

inferencia. Siguiendo este modelo, el valor F de ANOVA entre poblaciones fue calculado como CM_P / CM_N (donde CM_P y CM_N representan los cuadrados medios entre poblaciones y entre nidos respectivamente).

3.2.3. Análisis de componentes principales

En trabajos de morfometría, donde se analizan múltiples variables, un procedimiento general es reducir la matriz de datos a un número menor de combinaciones lineales de las variables, tratando de capturar la mayor parte de la variación del conjunto total de datos. Uno de los procedimientos más utilizados es el análisis de componentes principales que encuentra un conjunto de combinaciones lineales estandarizadas y ortogonales. El análisis de componentes principales (ACP) puede encuadrarse dentro del conjunto de técnicas multivariadas conocidas como métodos factoriales, donde también se incluyen el análisis de factores y el análisis de correspondencias. El ACP genera tantos componentes principales (CP) como variables utilizadas o medidas, pero típicamente sólo pocos ejes explican cantidades importantes de la variación total. Con este análisis se pretende sintetizar un gran conjunto de datos, y crear estructuras de interdependencia entre variables cuantitativas para crear unas nuevas variables que son función lineal de las originales, y de las que podemos hacer una representación gráfica, perdiendo la menor cantidad de información posible. El objetivo del análisis de componentes principales es el de reducir la dimensión de un conjunto de p variables a un conjunto m de menor número de variables para mejorar la interpretación de los datos. Las nuevas variables, las componentes principales (CP), determinan lo esencial de las variables originales, son una combinación lineal de ellas, y son independientes entre sí. El análisis de componentes principales es una técnica matemática que no requiere la suposición de normalidad multivariante de los datos, aunque si esto último se cumple se puede dar una interpretación más profunda de dichos componentes (Paz, 1998). El ACP

fue realizado utilizando el programa R (versión 2.7.1) (R Development Core Team, 2008) para identificar las variables más importantes en la diferenciación de poblaciones y nidos.

Siguiendo procedimientos usuales en morfometría, en este trabajo se consideró un componente, el CP1, como una medida de tamaño, y los otros CP son interpretados como medidas de forma.

Utilizando el mismo programa se aplicó un análisis de ANOVA utilizando los CP calculados, y luego se realizaron comparaciones de a pares entre poblaciones mediante el test de Tukey. Este test realiza comparaciones *a posteriori* de que la prueba de ANOVA detecta diferencias entre medias, para hallar qué medias son significativamente distintas de las otras (Paz, 1998).

3.2.4. Estudio de estructura poblacional y estimación de heredabilidad

La distribución de la variabilidad genética en las poblaciones y la estructura poblacional utilizando datos moleculares, se estudia generalmente mediante la estimación del estadístico F_{ST} (Capítulo 2, página 55). Para analizar la distribución de la variación fenotípica utilizando rasgos cuantitativos, el estadístico equivalente al F_{ST} es el Q_{ST} (Pressoir y Berthaud, 2004). Bajo estricta neutralidad y aditividad $F_{ST} = Q_{ST}$. La existencia de diferentes ambientes óptimos para diferentes poblaciones lleva a un valor de $Q_{ST} > F_{ST}$, mientras que un efecto selectivo entre las poblaciones de la misma especie dentro del ambiente óptimo, llevará a un $Q_{ST} < F_{ST}$ (Merilä y Crnokrak, 2001; McKay y Latta, 2002).

Para calcular el valor de Q_{ST} se consideró la varianza fenotípica total (V_P o σ^2_{Tot}) como: $\sigma^2_{Tot} = \sigma^2_{Pob} + \sigma^2_{nidos} + \sigma^2_{resid}$.

Asumiendo que los efectos alélicos para cada *locus* son aditivos entonces (Wright, 1965): $\sigma^2_{ST} = 2 F_{ST} \sigma^2_{adit}$ y

$$\sigma^2_{IS} = (1 + F_{IT} - 2 F_{ST}) \sigma^2_{adit} = (1 + F_{IS})(1 - F_{ST}) \sigma^2_{adit}$$

A partir de estas ecuaciones se puede estimar Q_{ST} como (Pressoir y Berthaud, 2004):

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{ST}^2 (1 + F_{IS})}{2\sigma_{IS}^2 + \sigma_{ST}^2 (1 + F_{IS})}$$

Ignorando los efectos epistáticos, la covarianza entre hermanos enteros (= varianza entre nidos) se compone de $\frac{1}{2} V_A + \frac{1}{4} V_D + V_{EC}$, donde V_A , V_D , y V_{EC} son componentes de varianza atribuidos respectivamente a efectos aditivos o reproductivos, desviación de dominancia y efecto de ambiente común (Falconer y Mackay, 1996). Entonces $\sigma_{ST}^2 = \sigma_{Pob}^2$ y $\sigma_{IS}^2 = V_A$ (Pressoir y Berthaud, 2004) y σ_{nidos}^2 es el máximo valor esperado para V_A . Debido a que no es posible eliminar experimentalmente V_D y V_{EC} , se estimó el valor máximo esperado σ_{IS}^2 como $2\sigma_{nidos}^2$.

Considerando una reproducción al azar efectiva en estas poblaciones, se asumió $F_{IS} = 0$. Entonces, se calculó el valor mínimo esperado para Q_{ST} como:

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{ST}^2}{2\sigma_{IS}^2 + \sigma_{ST}^2}$$

Los componentes de varianza fueron estimados mediante el método de máxima verosimilitud restringida o REML (*Restricted Maximum Likelihood*). Este método trabaja con combinaciones lineales de los valores observados cuyas esperanzas son 0 (Harville, 1977). Estos contrastes de error están libres de cualquier efecto fijo en el modelo. A diferencia del método de máxima verosimilitud, las estimas de varianza y covarianza usando REML son insesgadas.

La heredabilidad (h^2) de un carácter métrico es una de sus propiedades más importantes. Expresa la proporción de varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes. Pero su función más importante es su papel predictivo, que expresa la confiabilidad del valor fenotípico como indicador del valor reproductivo. Únicamente pueden medirse los

valores fenotípicos de los individuos, pero el valor reproductivo es lo que determina su influencia en la siguiente generación. Por lo tanto, si en un sistema de cría se escogen individuos como progenitores de acuerdo a sus valores fenotípicos, su éxito en cambiar las características de la población puede predecirse únicamente a partir del conocimiento del grado de correspondencia entre los valores fenotípicos y los reproductivos.

Este grado de correspondencia es medido a través de la heredabilidad en sentido estricto (h^2), que se define como la proporción de la variación fenotípica total (V_P) debida a la variación genética aditiva, es decir, a la varianza de los valores reproductivos de los genes (V_A):

$$h^2 = V_A / V_P$$

Este parámetro tiene un rango entre 0 y 1 y determina el potencial evolutivo de una población, ya que determina la tasa y cantidad de respuesta de la población a la selección direccional natural o artificial (Falconer, 1986).

Para estimar valores de heredabilidad (h^2) se calcularon los componentes de varianza en cada población mediante ANOVA de una vía. Los valores de heredabilidad se estimaron como: $h^2 = \sigma^2_{IS} / \sigma^2_{TOT}$.

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis de varianza

Los estadísticos descriptivos (media y desvío *standard*) para cada rasgo en cada nido se resumen en la Tabla 3.2.

Pob	EEE			CSA						EDP						AES						F_{POB}	F_{NID}
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P							
Nido	24.790	24.140	23.880	24.660	24.550	24.410	23.360	24.430	24.210	24.070	24.880	23.650	24.540	24.490	23.270	23.800	0.28	8.02**					
TTL (mm)	(0.425)	(0.732)	(0.492)	(0.519)	(0.591)	(0.532)	(0.390)	(0.396)	(0.949)	(0.682)	(0.278)	(0.350)	(0.366)	(0.468)	(0.416)	(0.716)							
SVL (mm)	12.210	11.730	11.540	11.900	11.780	11.760	11.430	12.260	11.890	11.940	12.180	11.740	12.210	11.920	11.510	11.510	0.32	12.34**					
	(0.247)	(0.452)	(0.324)	(0.288)	(0.181)	(0.217)	(0.397)	(0.117)	(0.482)	(0.217)	(0.114)	(0.284)	(0.260)	(0.343)	(0.257)	(0.185)							
DCI (mm)	34.038	33.379	33.317	33.457	33.545	33.166	32.244	34.142	32.998	33.053	33.817	32.734	33.963	33.630	32.976	33.589	0.55	8.40**					
	(0.414)	(0.891)	(0.540)	(0.611)	(0.464)	(0.613)	(0.708)	(0.423)	(0.800)	(0.711)	(0.482)	(0.531)	(0.470)	(0.447)	(0.340)	(0.539)							
SI (mm)	11.579	11.784	11.636	11.984	11.588	11.422	11.070	12.144	11.406	11.687	12.070	11.680	11.443	11.461	11.197	11.722	0.91	5.22**					
	(0.541)	(0.619)	(0.292)	(0.388)	(0.540)	(0.220)	(0.476)	(0.328)	(0.372)	(0.417)	(0.454)	(0.329)	(0.365)	(0.363)	(0.279)	(0.298)							
LCR (mm)	12.215	12.095	11.965	12.018	11.984	11.653	11.743	12.347	11.796	11.864	12.143	12.067	12.597	12.455	11.875	12.048	1.24	4.50**					
	(0.360)	(0.154)	(0.370)	(0.431)	(0.323)	(0.300)	(0.256)	(0.488)	(0.366)	(0.387)	(0.180)	(0.385)	(0.517)	(0.481)	(0.454)	(0.281)							
CW (mm)	20.582	21.061	21.544	21.627	20.636	20.759	20.464	21.633	20.370	21.057	21.734	20.780	21.160	20.892	20.775	21.264	0.23	7.74**					
	(1.003)	(0.495)	(0.523)	(0.466)	(0.388)	(0.388)	(0.756)	(0.529)	(0.805)	(0.780)	(0.383)	(0.467)	(0.302)	(0.477)	(0.304)	(0.279)							
SW (mm)	15.022	14.869	14.643	14.914	14.363	14.421	14.061	15.059	14.469	14.868	15.038	13.926	15.078	14.439	14.444	14.475	1.23	4.65**					
	(0.633)	(0.519)	(0.347)	(0.387)	(0.494)	(0.512)	(0.362)	(0.535)	(0.471)	(0.743)	(0.531)	(0.729)	(0.480)	(0.717)	(0.446)	(0.353)							
WN (mm)	5.344	5.082	4.953	5.087	5.137	5.153	4.667	4.859	4.767	4.776	4.549	5.153	4.852	4.913	5.072	5.051	1.62	4.28**					
	(0.394)	(0.199)	(0.239)	(0.217)	(0.317)	(0.371)	(0.481)	(0.254)	(0.346)	(0.253)	(0.288)	(0.283)	(0.371)	(0.246)	(0.192)	(0.183)							
ICW (mm)	2.038	2.116	2.123	2.534	1.836	2.151	2.346	2.038	2.438	2.227	2.163	2.949	1.652	1.984	2.044	2.012	2.88	7.36**					
	(0.175)	(0.155)	(0.113)	(0.166)	(0.104)	(0.283)	(0.345)	(0.134)	(0.206)	(0.314)	(0.236)	(0.252)	(0.337)	(0.153)	(0.247)	(0.174)							
ML (mm)	35.407	35.328	35.615	36.122	35.410	36.073	33.489	36.312	35.371	34.866	35.030	34.457	36.344	35.578	35.207	36.202	0.80	8.21**					
	(0.903)	(1.090)	(0.884)	(0.915)	(0.345)	(1.048)	(0.937)	(0.544)	(0.999)	(1.148)	(0.507)	(0.466)	(0.546)	(0.741)	(0.637)	(0.740)							
HN (g)	50.040	42.980	45.400	54.510	47.880	45.180	52.500	50.050	44.210	46.350	46.800	43.300	50.740	49.330	44.300	47.660	0.98	31.15**					
	(1.255)	(1.641)	(1.363)	(2.126)	(1.644)	(2.007)	(2.403)	(2.127)	(2.784)	(2.614)	(1.463)	(1.491)	(1.091)	(1.821)	(1.817)	(1.768)							

Tabla 3.2: Media y desvío *standard* (entre paréntesis) de las variables morfométricas en cada nido y estadísticos de ANOVA para la diferenciación entre poblaciones (F_{POB}) y entre nidos (F_{NID}). ** $P < 0.01$

Los análisis univariados de varianza, considerando nidos y poblaciones como factores al azar, indicaron que las diferencias entre poblaciones (F_{POB}) no son significativas ya que los gráficos de caja (*boxplots*) muestran solapamiento entre las distribuciones para todas las poblaciones y todos los rasgos (Fig. 3.2).

En cada gráfico de caja, la línea medial más oscura representa a la mediana, los límites inferiores y superiores de las cajas muestran el 25% y 75% de los datos respectivamente, y los extremos representan el rango total. Al construir gráficos de caja con las diferencias entre nidos, los nidos se denominaron con letras para cada población: EEE (nidos A-D), CSA (nidos E-H), EDP (nidos I-L) y AES (nidos M-P). Las diferencias entre nidos dentro de poblaciones (F_{NID}) son en todos los casos altamente significativas para todos o casi todos los rasgos entre varios nidos, algunos de la misma población. Los gráficos no se solapan en muchos de los casos (Fig. 3.3).

Estos datos sugieren alta variabilidad (= varianza) dentro de las poblaciones. La varianza entre familias es igual matemáticamente a la covarianza fenotípica (o parecido) entre individuos de la misma familia, y sería el resultado de poseer genes en común. Es decir que el alto parecido entre individuos de la misma familia indica que el rasgo está determinado genéticamente, al menos parcialmente. En este caso la alta diversidad entre familias podría sugerir variabilidad genética significativa si no se tienen en cuenta los efectos de dominancia, o de ambiente común, factores que no pudieron ser estimados en este trabajo.

A diferencia de los test univariados, el test global multivariado (MANOVA) mostró diferencias altamente significativas entre poblaciones (Wilks = 0.328, $P < 10^{-15}$), por lo que se podría pensar que las pequeñas diferencias halladas entre poblaciones sólo se ponen de manifiesto al considerar todas las características de manera conjunta.

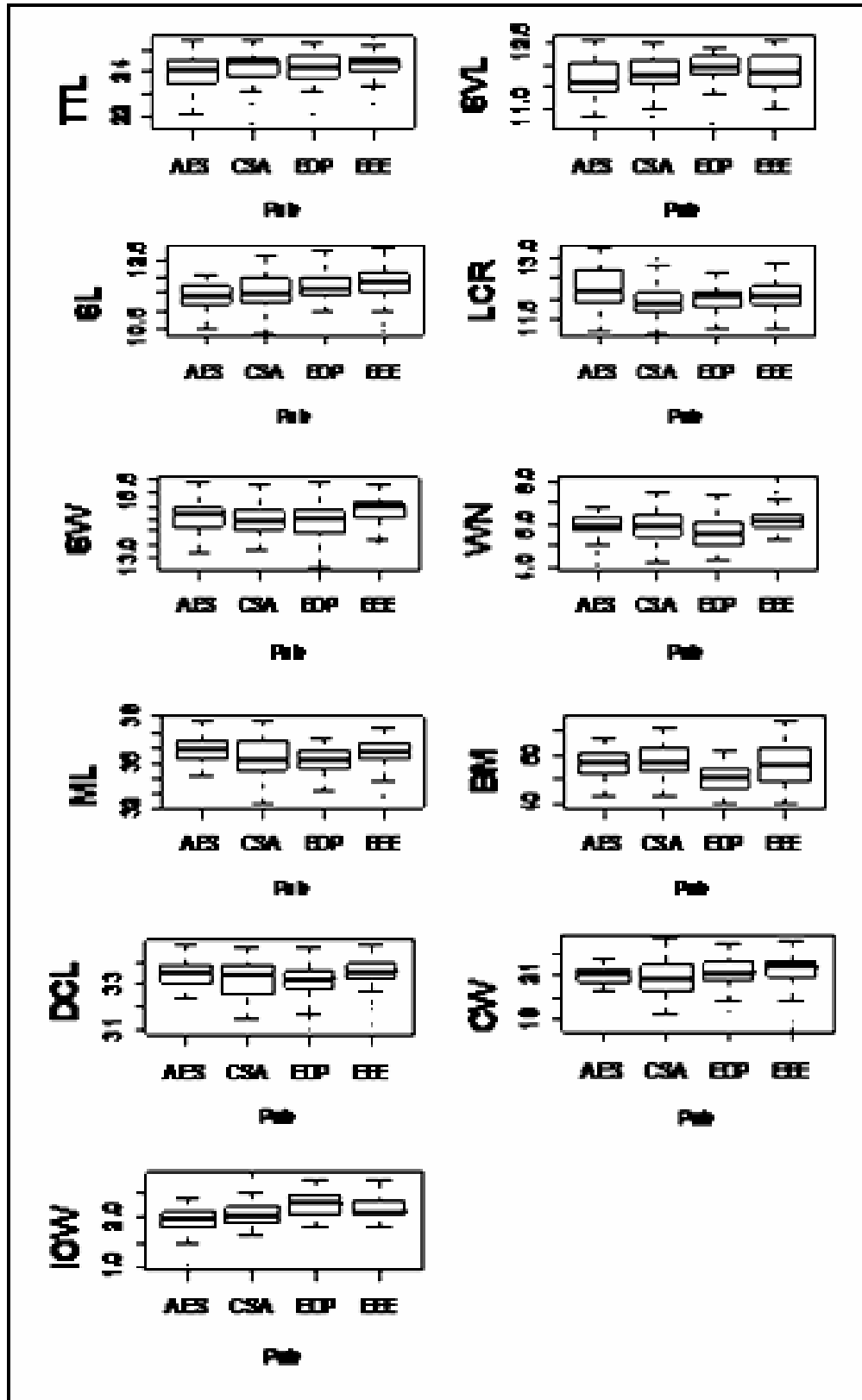


Figura 3.2: Gráficos de caja para cada rasgo morfométrico y cada población, mostrando diferencias entre poblaciones.

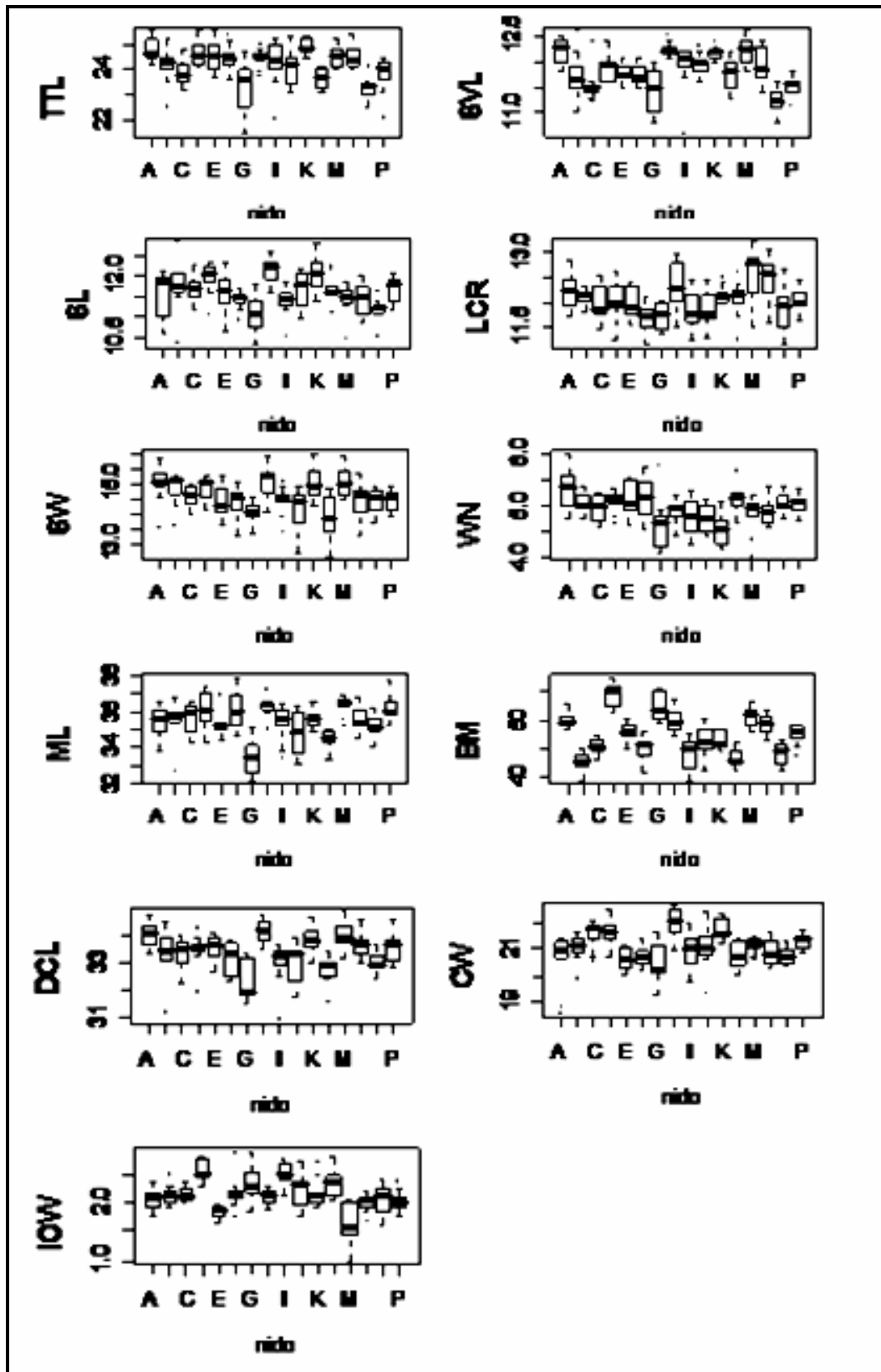


Figura 3.3: Gráficos de caja para cada rasgo morfométrico mostrando diferencias entre nidos

3.3.2. Análisis de componentes principales

En el análisis de componentes principales todos los rasgos estandarizados fueron utilizados para establecer 3 ejes principales no correlacionados (Tabla 3.3).

Rasgo	CP1	CP 2	CP 3
TTL	-0.373	0.060	-0.265
SVL	-0.333	0.046	-0.400
DCL	-0.413	0.146	0.056
SL	-0.320	-0.333	0.244
LR	-0.281	0.109	0.080
CW	-0.324	-0.404	0.109
SW	-0.333	-0.040	0.250
WN	-0.072	0.482	0.607
IOW	0.057	-0.660	0.152
ML	-0.354	0.073	0.156
BM	-0.219	0.111	-0.459
SD	2.178	1.127	1.022
Autovalor	4.744	1.270	1.045
Proporción de Varianza	0.431	0.115	0.095
Proporción Acumulada	0.431	0.547	0.642

Tabla 3.3: Representación de cada rasgo en los primeros tres componentes principales (CP), autovalores y proporción de la varianza total explicada por cada CP, obtenidos en el análisis de componentes principales.

Aunque los primeros 3 ejes explicaron sólo 64.2% de la varianza total, no fueron considerados ejes posteriores debido a que sus autovalores fueron menores que 1. El CP 1 depende en la misma proporción de todos los rasgos. El CP 2 fue principalmente determinado por CW, WN y IOW; y el CP 3 depende esencialmente de WN, SVL y BM.

Se realizaron los análisis de ANOVA para comparar los componentes principales, aplicando el modelo al azar. Los resultados de las pruebas univariadas se observan en la tabla 3.4.

ANOVA CP 1	GL	SC	CM	Valor F	Valor p
Poblaciones	3	338.54	112.85	0.9791	0.4350
Nidos	12	1383.13	115.26	27.949	< 2.2e-16***
Residuos	144	593.86	4.12		
ANOVA CP 2	GL	SC	CM	Valor F	Valor p
Poblaciones	3	13.210	4.403	0.3294	0.8042
Nidos	12	160.414	13.368	13.7590	<2.2e-16***
Residuos	144	139.906	0.972		
ANOVA CP 3	GL	SC	CM	Valor F	Valor p
Poblaciones	3	11.3259	3.7753	4.3896	0.02646*
Nidos	12	10.3207	0.8601	3.4258	0.0001936***
Residuos	144	36.151	0.251		

Tabla 3.4: Pruebas de ANOVA para cada CP. GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, códigos de significación: *** de 0 a 0.001, ** de 0.001 a 0.01, * de 0.01 a 0.05, . de 0.05 a 0.1.

Los resultados indican que la varianza entre poblaciones para los CP 1 y 2 es virtualmente cero y consecuentemente el valor *F* entre poblaciones es no significativo. En cambio para el CP 3, el componente de varianza entre poblaciones es mayor que entre nidos (dentro de población) y el valor *F* es significativo ($p= 0.02646$). Como se observó en la tabla 3.3, el CP 3 tiene un aporte pequeño a la varianza fenotípica total (9,5 %), y por ello es probable que los análisis de ANOVA individuales no produjeran diferencias significativas entre poblaciones. Pero con este nuevo análisis ahora se torna comprensible por qué el análisis MANOVA global (realizado con los datos originales) sí muestra diferencias significativas entre poblaciones.

Las comparaciones de a pares entre poblaciones aplicando el test de Tukey mostraron resultados no significativos para el CP 1 mientras que la mayoría de las comparaciones para el CP 2 fueron significativas. Para el CP 3, sólo una comparación resultó significativa (Tabla 3.5).

Pares	CP 1	CP 2	CP 3
CSA-AES	0.379 (0.860)	-0.540 (0.076)*	-0.344 (0.418)
EDP-AES	0.532 (0.690)	-1.524 (0.000)*	-0.144 (0.918)
EEE-AES	-0.537 (0.682)	-0.740 (0.006)*	0.341 (0.427)
EDP-CSA	0.152 (0.990)	-0.984 (0.000) *	0.200 (0.807)
EEE-CSA	-0.915 (0.233)	-0.200 (0.804)	0.685 (0.014)*
EEE-EDP	-1.068 (0.124)	0.784 (0.003)*	0.484 (0.138)

Tabla 3.5: Comparaciones de a pares entre poblaciones mediante el test de Tukey. Valores *P* entre paréntesis, *: valores significativos.

3.3.3. Estudio de estructura poblacional y estimación de heredabilidad

En el análisis de estructura poblacional, los mayores valores de varianza entre nidos se observan en los rasgos: TTL, DCL, ML y BM (Tabla 3.6).

Rasgo	Nivel	Varianza	Desvío Standard	Q_{ST}
TTL	Nidos	0.205	0.453	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	0.349	0.591	
SVL	Nidos	0.083	0.288	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	0.086	0.293	
DCL	Nidos	0.224	0.473	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	0.336	0.580	
SL	Nidos	0.069	0.262	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	0.167	0.409	
LCR	Nidos	0.049	0.220	0.019
	Población	0.004	0.062	
	Residuo	0.139	0.373	
CW	Nidos	0.164	0.404	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	0.295	0.543	
SW	Nidos	0.104	0.322	0.018
	Población	0.008	0.088	
	Residuo	0.284	0.533	
WN	Nidos	0.030	0.172	0.047
	Población	0.006	0.077	
	Residuo	0.090	0.300	
IOW	Nidos	0.032	0.180	0.119
	Población	0.018	0.132	
	Residuo	0.051	0.225	
ML	Nidos	0.481	0.693	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	0.698	0.836	
BM	Nidos	11.100	3.330	0.000
	Población	0.000	0.000	
	Residuo	3.700	1.920	

Tabla 3.6: Componentes de varianza y valores Q_{ST} para cada rasgo.

Los valores de varianza entre poblaciones fueron muy bajos, siendo los mayores datos registrados para: LCR (0.004 ± 0.062), SW (0.008± 0.088), WN (0.006± 0.077) e IOW (0.018±0.132). Estas cuatro medidas de la cabeza fueron los únicos rasgos que mostraron valores de Q_{ST} distintos de cero: 0.019, 0.018, 0.047 y 0.119 respectivamente. En los siete rasgos restantes los valores Q_{ST} obtenidos fueron 0 (Tabla 3.6).

Los valores estimados de heredabilidad a partir de los componentes de varianza se muestran en la Tabla 3.7.

Pob	TTL	SVL	DCL	SL	LCR	CW	SW	WN	IOW	ML	BM
EEE	0.67**	0.75**	0.29 ⁺	0	0	0.61**	0	0.41*	1.34**	0	1.81**
CSA	0.76**	1.27**	1.31**	1.04**	0.81**	1.19**	0.78**	0.46*	0.81**	1.35**	1.37**
EDP	0.72**	0.41*	0.59**	0.55**	0.23 ⁺	0.60**	0.65**	0.79**	0.38*	0.45*	0.62**
AES	1.13**	1.44**	0.84**	0.48*	0.65**	0.49*	0.42*	0.13	0.65**	0.71**	1.40**

Tabla 3.7: Valores de heredabilidad estimados de cada rasgo en cada población. (+: 0.05 ≤ P < 0.1; *: 0.01 ≤ P < 0.05; **: P < 0.01).

En la mayor parte de los casos, las estimaciones de heredabilidad fueron significativas. Notablemente, la población EEE mostró valores de heredabilidad de 0 en cuatro rasgos. El rasgo que mostró valores mayores de heredabilidad, y altamente significativos en todas las poblaciones fue BM, que fue el rasgo que reveló además mayor varianza entre nidos. En segundo lugar, TTL también tuvo altos valores de varianza entre nidos y fue el otro rasgo con valores de heredabilidad altamente significativos en todas las poblaciones analizadas.

3.4. Conclusiones generales del Capítulo

- En coincidencia con datos de otros autores (Wu *et al.*, 2006; Verdade, 1997), quienes hallaron baja variación morfológica, en este estudio las pruebas univariadas (ANOVA) no mostraron diferencias significativas entre poblaciones. Sin embargo, se hallaron diferencias altamente significativas en los rasgos cuantitativos entre nidos dentro de las poblaciones.

- El test global multivariado (MANOVA), en cambio, mostró diferencias altamente significativas entre poblaciones. Estos resultados parecen sugerir que, considerando todos los rasgos como un fenotipo global, las diferencias individuales podrían acumularse mostrando resultados significativos.
- Teniendo en cuenta el ACP, la mayoría de los rasgos tienen una contribución similar al CP1, el cual refleja diferencias en el tamaño del cuerpo. En el CP2 tres rasgos (CW, WN y IOW) tienen una contribución importante y de modo similar, el CP3 está también determinado por tres rasgos (WN, SVL y BM). Esto sugiere que ambos componentes están asociados a diferencias en la forma del cuerpo.
- Los componentes de varianza estimados para los componentes principales mostraron mayores niveles de varianza entre nidos que entre poblaciones. Debido a que sólo el CP2 y el CP3 mostraron diferencias significativas en las comparaciones de a pares, se puede concluir que la diferenciación fenotípica está más relacionada con la forma corporal que con el tamaño del cuerpo.
- Se observó que algunas medidas de la cabeza (WN e IOW) tienen importante influencia sobre la variabilidad morfológica, lo cual podría ser consecuencia del rol importante de estos rasgos en comportamientos reproductivos y quizás, también, alimentarios.
- Altos valores de variabilidad en algunos rasgos se correspondieron con alta heredabilidad en los mismos. La alta heredabilidad estimada para algunos rasgos (TTL, SVL, CW, y BM) indica el gran potencial para mejorarlos en planes de manejo, puesto que este parámetro es una medida de la respuesta esperada a la selección direccional.

3.5. Bibliografía citada

- Bookstein, F.; Chernoff, B.; Elder, R.; Humphries, J.; Smith, G.; Strauss, R. 1979. Morphometrics in Evolutionary Biology Special Publication 15. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, USA.
- Cheverud, J.M.; Routman, E.J.; Irschick, D.J. 1997. Pleiotropic effects of individual gene loci on mandibular morphology. *Evolution* 51: 2006–2016.
- Crisci, J. V.; López Armengol, M. F. 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Serie Biología. Monografía No 26. O.E.A., USA.
- Endler, J.A. 1986. Natural Selection in the wild (Monographs in population biology). Princeton, University Press, Princeton, NJ, USA.
- Falconer, D.S. 1986. Introducción a la Genética Cuantitativa. Compañía Editorial Continental S.A de C.V., México, México.
- Falconer, D.S.; Mackay, T.F.C. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Harville, David A. 1977. Maximum Likelihood Approaches to Variance Component Estimation and to Related Problems. *Journal of the American Statistical Association* 72 (358): 320–338.
- Isberg, S.; Thomson, P.; Nicholas, F.; Barker, S.; Moran, C. 2004. Farmed saltwater crocodile. A genetic improvement program. Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, Sydney, Australia.
- Klingenberg, C.P. 1996. Multivariate allometry. En: Marcus, L.F.; Corti, M.; Loy, A.; Naylor, G.J.P.; Slice, D.E. (Eds.). *Advances in Morphometrics*, Plenum Press, New York, USA: 23–49.
- Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33:402–416.

- Leamy, L.J.; Routman, E.J.; Cheverud, J.M. 1999. Quantitative trait loci for early- and late-developing skull characters in mice: a test of the genetic independence model of morphological integration. *The American Naturalist* 153: 201–214.
- Lleonart, J.; Salat, J.; Torres, G.J. 2000. Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology* 205: 85–93.
- Marroig, G. 2007. When size makes a difference: allometry, life-history and morphological evolution of capuchins (*Cebus*) and squirrels (*Saimiri*) monkeys (Cebinae, Platyrrhini). *BMC Evolutionary Biology*: 7-20.
- McKay, J.M.; Latta, G. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution* 17:285-291.
- Merilä, J.; Crnokrak, P. 2001. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* 14:892-903.
- Milton, J.S. 2001. *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. 3ª. Edición. Mc. Graw – Hill, Interamericana, Madrid, España.
- Miranda, M.P.; Vanini de Moraes, G.; Nunes Martins, E.; Pinto Maia, L.C.; Rus Barbosa, O. 2002. Thermic variation in incubation and development of Pantanal Caiman (*Caiman crocodylus yacare*) (Daudin, 1802) kept in metabolic box. *Brazilian archives of Biology and Technology* 45 (3): 333-342.
- Montague, J.J. 1984. Morphometric analysis of *Crocodylus novaeguineae* from the Fly River Drainage, Papua New Guinea. *Australian Wildlife Research* 11(2): 395-414.
- Monteiro, L.R.; Cavalcanti, M.J.; Sommer, H.J.S. 1997. Comparative ontogenetic shape changes in the skull of *Caiman* species (Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Morphology* 231: 53-62.
- Olson, E. C.; Miller, R.L. 1958. *Morphological integration*. University of Chicago Press, Chicago, USA.

- Paz, J. 1998. Manual de Bioestadística. Ed. Instituto Universitario CEMIC (Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno"-Hospital Asociado Facultad de Medicina). Buenos Aires, Argentina.
- Pressoir, G.; Berthaud, J. 2004. Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity* 92: 95-101.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
- Riska, B. 1986. Some models for development, growth, and morphometric correlation. *Evolution* 40:1303–1311.
- Rohlf, J.F.; Bookstein, F.L. 1987. A comment on shearing as a method for "size correction". *Systematic Zoology* 36:356–367.
- Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, USA.
- Sokal, R.R. 1986. Spatial data analysis and historical processes. En: Diday, E.; Escoufier, Y.; Lebart, L.; Pages, J. ; Schektman, Y. ; Tomassone, R.(Eds.). *Data Analysis and Informatics IV*. Science Publishers, Amsterdam, Holanda: 29-43.
- Somers, K.M. 1986. Multivariate allometry and removal of size with principal component analysis. *Systematic Zoology* 35:359–368.
- Verdade LM. 1997. Morphometric analysis of the Broad-snout caiman (*Caiman latirostris*): An assessment of individual's Clutch, Body size, Sex, Age, and Area of origin. PhD Dissertation, Univ. of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- Verdade, L.M. 2000. Regression equations between body and head measurements in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Revista Brasileira de Biologia* 60: 469-482.
- Verdade, L.M. 2001. Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Brazilian Journal of Biology* 61:431-435.
- Villée, C.A. 1996. *Biología*. Octava edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.

- Weber, K.; Eisman, R.; Morey, L.; Patty, A.; Sparks, J.; Tausek, M.; Zeng, Z.B. 1999. An analysis of polygenes affecting wing shape on chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153: 773–786.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by Fstatistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395–420.
- Wu, X.B.; Xue, H.; Wu, L.S.; Zhu, J.L.; Wang, R.P. 2006. Regression analysis between body and head measurements of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) in the captive population. *Animal Biodiversity and Conservation* 29: 65- 71.
- Zelditch, M.L.; Swiderski, D.L.; Sheets, H.D., Fink, W.L. 2004. Geometric morphometrics for Biologist. A primer. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Capítulo 4

ANÁLISIS DE PATERNIDAD



4.1. Introducción

4.1.1. Análisis de sistemas de apareamiento

Las estrategias reproductivas en vertebrados se dan como un continuo, dependiendo del grado de exclusividad en el apareamiento, de la disponibilidad de recursos y de la duración del cortejo (Wells, 1977). En un extremo de ese continuo está la monogamia territorial, un sistema en el cual cada macho defiende el área que ocupa con la hembra con la cual se aparea, del ingreso de otros machos o de otras hembras. En estos sistemas, la estación de cortejo y apareamiento tiene lugar durante varias semanas o meses. En el otro extremo del espectro están los cruzamientos explosivos o agregados que ocurren en muy corto período de tiempo, con poca o ninguna exclusividad del espacio o de los individuos que se aparean (Wells, 1977). En estos sistemas de apareamiento agregados, machos y hembras típicamente arriban juntos a un lugar neutral para un breve período de apareamiento. Bajo estas circunstancias se establece un sistema al azar donde cada individuo que compite por la reproducción tiene una pequeña oportunidad de aparearse y pocos son los individuos exitosos que lo logran (Nunney, 1993).

Los datos etológicos acerca de comportamientos reproductivos en *C. latirostris*, así como en la mayoría de los cocodrilianos, son muy limitados debido a que las cópulas se realizan en el agua entre grupos de machos y hembras que no son fácilmente distinguibles, y las observaciones claras no son frecuentemente posibles. Como regla general entre los cocodrilianos, son comunes las jerarquías de dominancia entre los machos, donde los más grandes y agresivos controlan el acceso a los recursos y al apareamiento (Lang, 1989).

La información certera acerca del sistema de apareamiento es esencial para estudiar posibles efectos de endogamia, para verificar genealogías de ejemplares utilizados en planes de manejo, y para determinar el tamaño efectivo de las poblaciones (Frankham *et al.*, 2002). Además, el análisis de todos estos aspectos reproductivos, puede aportar

datos fundamentales acerca del mantenimiento de los niveles de variabilidad genética existente en las poblaciones.

4.1.2. Utilización de marcadores moleculares para asignación de parentescos

Debido a las dificultades de los estudios etológicos en relación con la reproducción, en muchas especies, actualmente, los análisis de esta temática se realizan mediante el estudio de microsatélites (SSR). Estos marcadores codominantes han demostrado ser muy poderosos en la detección de polimorfismos debido a sus altos valores de variación, por lo que se han convertido en los marcadores elegidos para análisis de variabilidad así como de parentesco.

La información proveniente de un marcador molecular, como los SSR, analizado en la madre, los hijos y los padres probables, puede ayudar a resolver genealogías no resueltas por los métodos tradicionales de asignación, que se realizan a través de caracteres morfológicos compartidos entre parientes. Si un alelo del marcador molecular presente en el genotipo de los hijos no pertenece al genotipo de la madre, se considera derivado de la línea paterna. Si dicho alelo no está presente en un padre considerado probable, entonces ese macho debe ser excluido como padre potencial, a menos que haya ocurrido una mutación. Si se utilizan muchos *loci* se puede realizar una asignación de paternidad para un grupo de descendientes con altos valores de probabilidad (Frankham *et al.*, 2002).

Debido a que las hembras de la mayoría de los cocodrilianos muestran cuidados maternos de sus nidos, en el presente trabajo, para el análisis de cada familia, se utilizan muestras de los pichones de un nido, y de la hembra que se encuentra al cuidado de ese nido o en sus cercanías, considerada la madre probable de los pichones.

4.1.3. Estudios del sistema de apareamiento en cocodrilianos mediante marcadores moleculares

El primer trabajo realizado aplicando análisis de microsatélites al estudio de esta temática específica fue realizado por Davis *et al.* (2001). Los autores utilizaron 5 *loci* microsatélites específicos, para estudiar 22 familias (madre probable y pichones) de *Alligator mississippiensis*, especie perteneciente a la misma Familia que *C. latirostris* (Alligatoridae). Sus resultados demostraron que en siete familias estudiadas existió el comportamiento de múltiple paternidad, es decir, la existencia de más de un padre en una nidada. Esta misma conducta también fue hallada en 5 de un total de 10 nidos de *Crocodylus moreletii* en Belice, recientemente reportada por Mc Vay *et al.*, (2008). Este comportamiento se considera ventajoso para muchas especies, ya que incrementa la aptitud promedio de la población, posibilita el mantenimiento de la variación genética de la descendencia y reduce el efecto de la endogamia a través de un aumento del tamaño efectivo poblacional (Sugg y Chesser, 1994).

No existen trabajos previos en *C. latirostris* acerca del sistema de apareamiento. Como en la mayoría de los cocodrilianos, se ha aplicado el estudio de los microsatélites para el análisis de variabilidad y estructura genética poblacional de esta especie (Verdade *et al.*, 2002; Villela, 2004, Villela *et al.*, 2008). A excepción de un trabajo de Isberg *et al.* (2004a), quienes han utilizado los SSR en la confirmación de genealogías de *Crocodylus porosus*, el resto de los antecedentes refieren a variabilidad de otros cocodrilianos mediante el uso de dicha técnica (Davis *et al.*, 2000, 2002; Glenn *et al.*, 1998; Fitzsimmons *et al.*, 2000, 2002; Dever *et al.*, 2002; Isberg *et al.*, 2004b).

4.1.4. Definición y método de análisis de microsatélites

Los microsatélites (SSR: repeticiones de secuencia simple) son muy utilizados como marcadores moleculares por su simplicidad y su gran distribución dentro de los genomas eucariotas. Están constituidos por la repetición en tándem de una secuencia corta de

Para determinar el número de repeticiones que posee un individuo en un *locus* dado se amplifica esa secuencia por PCR (ver Capítulo 2, página 39) a partir del ADN de cada individuo. Para ello es necesario conocer las secuencias flanqueantes a estas repeticiones con el fin de diseñar cebadores (*primers*) complementarios a las mismas y así poder amplificar la región de la repetición propiamente dicha. Los fragmentos amplificados de diferente tamaño, por poseer diferente número de nucleótidos pueden ser separados y diferenciados mediante sistemas electroforéticos de alta resolución (Decroocq, 2003) (Fig. 4.2).

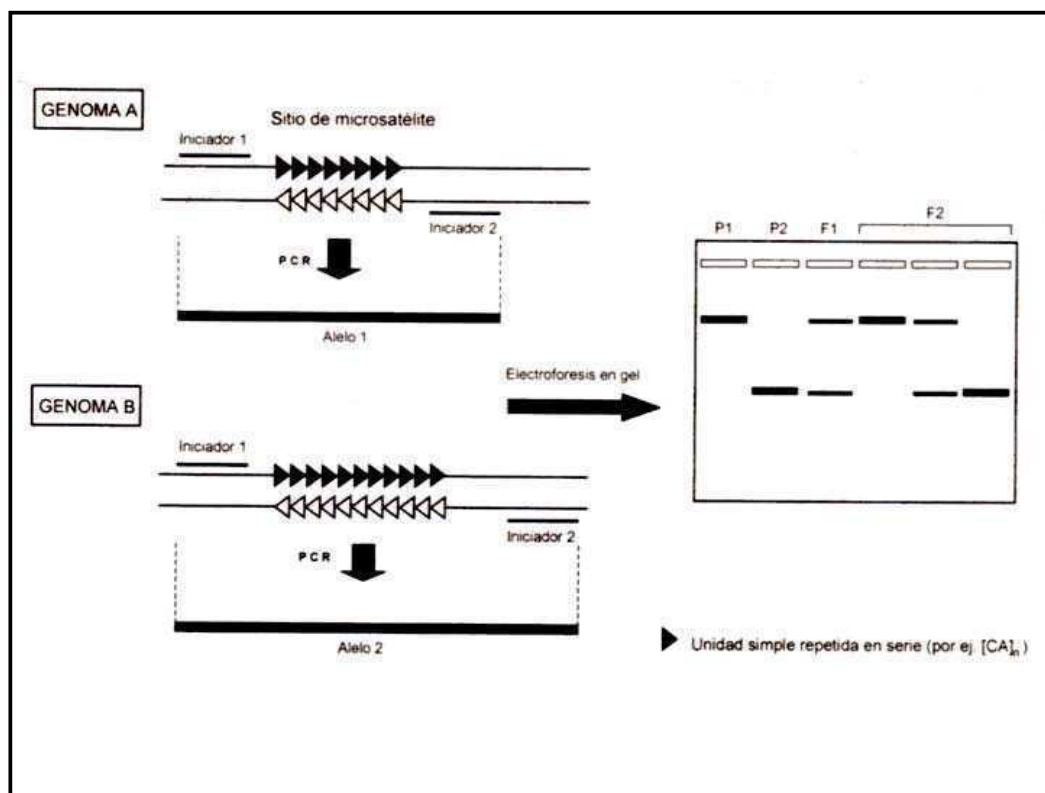


Figura 4.2: Un *locus* específico para un microsatélite es amplificado en el genoma A y en el genoma B con la ayuda de dos cebadores o iniciadores específicos que flanquean esta región (iniciador 1 e iniciador 2). Los productos de amplificación difieren en longitud entre los dos genomas (alelo 1 vs. alelo 2) y su polimorfismo puede ser detectado por electroforesis en geles de alta resolución y posterior detección con nitrato de plata, o por secuenciador automático. La técnica de SSR permite visualizar alelos específicos para discriminar entre condiciones homocigotas y heterocigotas de un alelo. P1 y P2: progenitores; F1 y F2 primera y segunda generación filial.

En resumen, el uso de los microsatélites como marcadores se sustenta en tres etapas: aislamiento y caracterización de los microsatélites, diseño de los cebadores

específicos de las secuencias flanqueantes, e investigación de las diferencias de tamaño entre individuos. El aislamiento posee tres etapas: creación de un banco de fragmentos cortos de ADN genómico en plásmidos bacterianos, hibridación de los clones con sondas marcadas y secuenciación de clones positivos. A partir de la secuencia obtenida en los clones, se realiza el diseño de la secuencia de los cebadores específicos para amplificar cada microsatélite. En el presente trabajo se utilizaron cebadores diseñados por Zucoloto *et al.* (2002) específicamente para *C. latirostris*.

Posteriormente a la amplificación por PCR del ADN de cada individuo, los productos de amplificación pueden ser separados utilizando geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los cebadores son generalmente elegidos de manera que permitan amplificar un fragmento de tamaño comprendido entre 80 y 200 pb, lo cual posibilita una buena separación de los fragmentos. En el caso de análisis a gran escala, son frecuentemente utilizados secuenciadores automáticos, los cuales detectan fragmentos a través del uso de cebadores conjugados a colorantes fluorescentes y determinan el tamaño de los fragmentos por comparación con marcadores de peso molecular como referencia.

4.1.5. Objetivos e Hipótesis

Los Objetivos particulares para este capítulo fueron:

- *Examinar los patrones de bandas de microsatélites en familias de C. latirostris y determinar los genotipos de las madres y de los descendientes.*
- *Evaluar la existencia de múltiple paternidad en C. latirostris.*

Las *Hipótesis* a comprobar son:

- Debido a que las hembras de cocodrilianos de la familia Alligatoridae en general muestran comportamiento de defensa hacia sus nidadas, se espera

confirmar la maternidad de dichas hembras con respecto a los pichones presentes en el nido.

- Teniendo en cuenta los antecedentes de múltiple paternidad registrados en la familia Alligatoridae, se espera encontrar indicios de este comportamiento en *C. latirostris*.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Metodología para Análisis de ADN

4.2.1.1. Obtención de muestras

Cuatro ejemplares hembras de *C. latirostris* que se encontraban al cuidado de nidos en poblaciones de Santa Fe fueron capturadas mediante lazos, y fueron medidas y pesadas. De cada una se obtuvo una muestra de sangre por punción de la vena yugular interna a nivel de las vértebras cervicales (Tourn *et al.*, 1993; Zippel *et al.*, 2003). La sangre fue diluida en proporción (1:10) en *buffer* para conservación a temperatura ambiente (Longmire *et al.*, 1988). Los huevos hallados en cada nido fueron recolectados para su incubación artificial a 31.5 °C, con 95% de humedad relativa en las instalaciones del Proyecto Yacaré en la ciudad de Santa Fe. Cinco días después del nacimiento de las crías, se seleccionaron entre 10 y 15 pichones al azar de cada nido, y de cada uno de estos ejemplares se obtuvo una muestra de sangre utilizando la misma metodología que para el muestreo de hembras.

Los pichones muestreados fueron alojados en piletones de cría de las instalaciones del Proyecto Yacaré de Santa Fe para formar parte de la reserva de animales mantenidos en cautiverio hasta su liberación o su ingreso a la etapa de engorde comercial.

4.2.1.2. Aislamiento y purificación de ADN

La metodología aplicada para la extracción de ADN fue la descrita por Murray y Thompson (1980), previamente explicada en el Capítulo 2 (página 46).

4.2.2. Evaluación del polimorfismo mediante cebadores específicos (microsatélites – SSR)

4.2.2.1. Selección de los cebadores

Se evaluaron 8 cebadores diseñados por Zucoloto *et al.* (2002) para *C. latirostris*: *Clap* 2, *Clap* 5, *Clap* 6, *Clap* 7, *Clap* 8, *Clap* 9, *Clap* 10, y el cebador *Amiμ* 20 desarrollado para *A. mississippiensis* por Glenn *et al.* (1998). Las secuencias de cada uno se resumen en la tabla 4.1.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Buffer óptimo
<i>Clap</i> 2a	CCT TCA GGA CCC ACT TTC TT	A (7.5 mM Cl ₂ Mg, pH 8.5)
<i>Clap</i> 2b	CGA ATC CCT CTT CCC AAA CT	
<i>Clap</i> 5a	GCG TAG ACA GAT GCA TGG AA	F (10 mM Cl ₂ Mg, pH 9.0)
<i>Clap</i> 5b	CAG TCT GAA GCT AGG GCA AA	
<i>Clap</i> 6a	GAA ATA TGG GAC AGG GAG GA	J (10 mM Cl ₂ Mg, pH 9.5)
<i>Clap</i> 6b	GGT TGG CTG CAT GTG TAT GT	
<i>Clap</i> 7a	CGG GGT CTT GGT GTT GAC TA	F (10 mM Cl ₂ Mg, pH 9.0)
<i>Clap</i> 7b	CGG GAC CAG GAG CTG TAT AA	
<i>Clap</i> 8a	CAG CCA CTG AAG GAA TTG AC	F (10 mM Cl ₂ Mg, pH 9.0)
<i>Clap</i> 8b	CAC ATA CCT GAC CCA GCT TAT C	
<i>Clap</i> 9a	ACA GGG GAA AAG AAG AGC TG	A (7.5 mM Cl ₂ Mg, pH 8.5)
<i>Clap</i> 9b	AAA ATC CCC CAC TCT TAC CC	
<i>Clap</i> 10a	TGG TCT TCT CTT CGT GTC CT	A (7.5 mM Cl ₂ Mg, pH 8.5)
<i>Clap</i> 10b	ATG AGC CCC TCT ATG TTC CT	
<i>Amiμ</i> 20a	TTT TTC TTC TTT CTC CAT TCT A	Standard (2.5 mM Cl ₂ Mg, pH 8.3)
<i>Amiμ</i> 20b	GAT CCA GGA AGC TTA AAT ACA T	

Tabla 4.1. Cebadores evaluados: secuencias y *buffers* óptimos para cada uno.

Las condiciones de PCR fueron puestas en práctica siguiendo la metodología de Zucoloto *et al.* (2002) con algunas modificaciones: las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15 μ l con 2X del *buffer* específico del *Kit Optimizer* para PCR de Invitrogen (excepto cuando se usó el cebador *Amiμ* 20), 1.2 μ l de cada cebador

(0.1nM/ μ l), 0.6 μ l de mezcla de dNTP (200 μ M), 0.06 μ l de *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μ l) de Promega y 50 ng de ADN genómico. Todos los *buffers* del *kit Optimizer* para PCR (Invitrogen) fueron evaluados en la amplificación de todos los cebadores específicos para *C. latirostris*. Las reacciones de amplificación usando el cebador *Ami* μ 20 fueron realizadas utilizando el *buffer standard* para PCR de Promega (Tabla 4.1). En cada reacción se incluyó un control negativo conteniendo todos los reactivos, pero exceptuando ADN genómico.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA). Las amplificaciones se realizaron usando varias temperaturas para el pegado del cebador, entre 55° C y 65° C, y tres programas diferentes de ciclado (Tabla 4.2).

Microsatélite	Paso 1	Paso 2	Extensión Final
<i>Clam</i> 5, <i>Clam</i> 9 y <i>Clam</i> 10	15 ciclos (1 min) 94° C (1 min) 64° C (1 min) 72° C	20 ciclos (1 min) 94° C (1 min) 60° C (0.45 min) 72° C	(7 min) 72° C
<i>Clam</i> 2, <i>Clam</i> 6 y <i>Clam</i> 7	35 ciclos (1 min) 94° C (1 min) 60° C (1 min) 72° C		(7 min) 72° C
<i>Clam</i> 8 y <i>Ami</i> μ 20	35 ciclos (1 min) 94° C (1 min) 57° C (1 min) 72° C		(7 min) 72° C

Tabla 4.2: Condiciones óptimas de PCR para cada microsatélite.

4.2.2.2. Análisis de productos amplificados

Las amplificaciones exitosas se confirmaron mediante la separación de los productos de PCR en geles de agarosa al 2% con *buffer* TBE 0.5 X (Tris 0.89 M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 0.11 M, pH 8.3). Los geles se tiñeron utilizando bromuro de etidio y se analizaron bajo luz UV. Las amplificaciones se consideraron exitosas cuando produjeron bandas de tamaño molecular concordante con el rango establecido Zucoloto *et al.* (2006). Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% a 2.200 V y 75W, que fueron teñidos con solución de NO_3Ag

(Bassam *et al.*, 1991). La metodología de preparación de estos geles fue descrita en el Capítulo 2 (página 49). Los tamaños moleculares medidos en pares de bases (pb) se estimaron utilizando un marcador de 100 pb. También se utilizaron otros marcadores, empleados en análisis de filiación humana: CTT Allelic Ladder Mix, FFv Allelic Ladder Mix y STR III Allelic Ladder Mix del sistema Gene Print Silver STR III de Promega, como marcadores alternativos para estimar los tamaños de las bandas bajo análisis.

Las muestras fueron analizadas por familias (cada hembra con los pichones de su nidada), y en general, se corrieron las muestras de dos familias amplificadas con el mismo cebador por cada gel, siempre utilizando marcadores de tamaño en la primera y en la última calle de corrida.

Todos los geles fueron documentados mediante fotografías con cámara digital (Kodak C330) utilizando modo macro.

4.2.2.3. Análisis de parentesco

A través del análisis de las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida se asignó el tamaño a cada alelo hallado por cada *locus*, y con esta metodología se organizaron los genotipos de cada individuo en las familias.

Se utilizaron tres sistemas de análisis: el Método Mínimo Simple *Locus* (Myers y Zamudio, 2004), el programa Cervus 3.0 (Marshall *et al.*, 1998) y el programa Gerud 2.0 (Jones, 2005).

Aplicando el Método Mínimo Simple *Locus* se utilizó el conteo de alelos y genotipos para evaluar la presencia de más de dos progenitores en cada nido: Este método asigna paternidad múltiple en una nidada considerando que todos los alelos no aportados por el genotipo materno son proporcionados por el paterno. Se consideró la existencia de paternidad múltiple cuando luego de reconstruir el genotipo materno, tres o más alelos adicionales estuvieron presentes en los genotipos de los pichones.

Cervus 3.0 y Gerud 2.0 son programas informáticos que examinan datos genéticos a partir de marcadores genéticos codominantes y realizan análisis de parentesco.

Utilizando Cervus 3.0, las pruebas de parentesco (paternidad) se realizaron en dos pasos, primero utilizando todos los individuos juntos, y posteriormente considerando los grupos familiares (una hembra con un mínimo de diez pichones).

Gerud 2.0 reconstruye los genotipos parentales a partir de los arreglos genotípicos de una progenie de medio-hermanos con padres conocidos o desconocidos. Utilizando los genotipos de cada grupo familiar y sus frecuencias alélicas, se determinaron las madres compatibles y luego se probaron todos los posibles genotipos paternos, para calcular la mínima combinación de padres que explique mejor el lote de datos. Se calcularon las probabilidades relativas basadas en las frecuencias alélicas estimadas y considerando segregación mendeliana.

4.3. Resultados

Los geles de poliacrilamida revelaron bandas que se asignaron a los diferentes alelos presentes en los genotipos. Los alelos se nombran de acuerdo a su tamaño molecular en pb (Fig. 4.3).

El genotipo de todas las hembras y pichones fueron exitosamente reconstruidos usando cuatro de los ocho marcadores microsatélites evaluados: *Clap* 2, *Clap* 6, *Clap* 9 y *Clap* 10. Los otros cuatro cebadores amplificaron bandas no específicas que complicaron los análisis en los geles, por lo cual no fueron incluidos en los análisis de datos. Los productos amplificados a partir de cada par de cebadores mostraron cuatro alelos cada uno, los que variaron en tamaño desde 139 pb (*Clap* 9) a 220 pb (*Clap* 10). Los alelos detectados se describen en la Tabla 4.3.

Locus	Alelos detectados (pb)
Clau 2	204, 206, 210 y 214
Clau 6	159, 161, 163 y 165
Clau 9	139, 164, 166 y 168
Clau 10	214, 216, 218 y 220

Tabla 4.3: Alelos hallados para cada locus en las familias analizadas

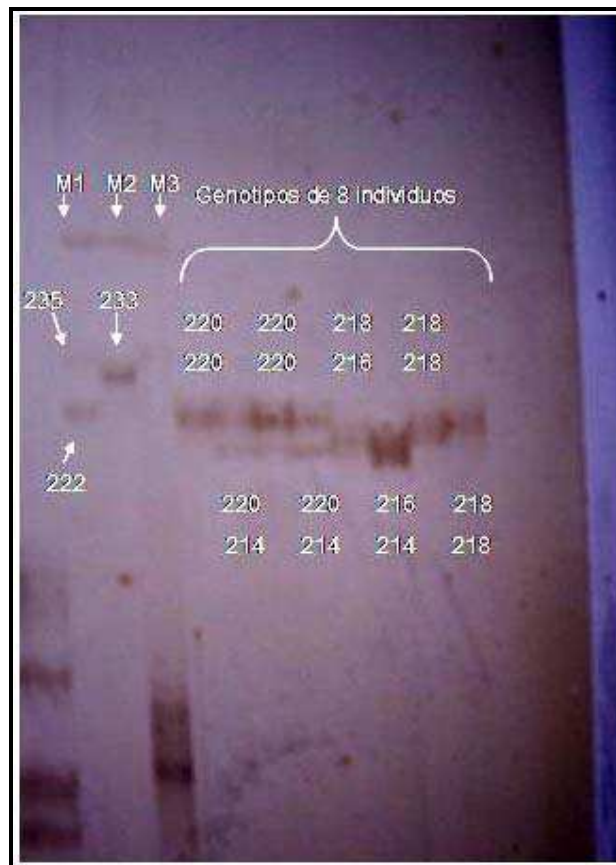


Figura 4.3: Genotipos, designados por el tamaño de los alelos, de 8 individuos en el locus Clau 10 mediante comparación con tres marcadores de tamaño molecular (M1, M2 y M3).

A partir de los patrones de bandas obtenidos para cada individuo en cada locus se elaboró la tabla 4.4, donde se reconstruyen los genotipos de las familias y se propone el número mínimo de genotipos paternos.

Familias	Individuos	Loci (Genotipos)			
		Clap 2	Clap 6	Clap 9	Clap 10
Familia 1	Madre	206 / 206	159 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 1	206 / 206	159 / 163	139 / 168	220 / 220
	Hijo 2	206 / 206	161 / 165	139 / 166	214 / 220
	Hijo 3	206 / 206	159 / 161	139 / 168	220 / 220
	Hijo 4	206 / 206	159 / 161	139 / 168	220 / 220
	Hijo 5	206 / 206	159 / 161	139 / 168	214 / 220
	Hijo 6	206 / 206	163 / 165	139 / 168	214 / 220
	Hijo 7	206 / 206	159 / 161	139 / 168	214 / 220
	Hijo 8	206 / 206	163 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 9	206 / 206	-----	139 / 166	220 / 220
	Hijo 10	206 / 206	163 / 165	139 / 166	220 / 220
	Hijo 11	206 / 206	159 / 165	139 / 168	214 / 220
	Hijo 12	206 / 206	161 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 13	206 / 206	159 / 161	139 / 168	220 / 220
	Hijo 14	206 / 206	163 / 165	139 / 168	220 / 220
Hijo 15	206 / 206	159 / 165	139 / 168	214 / 220	
N° mínimo de genotipos paternos en cada locus		1	2	1	1
Familia 2	Madre	210 / 210	159 / 165	164 / 168	220 / 220
	Hijo 1	210 / 210	159 / 159	164 / 168	220 / 220
	Hijo 2	206 / 210	165 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 3	214 / 214*	161 / 165	168 / 168	220 / 220
	Hijo 4	-----	159 / 159	164 / 168	220 / 220
	Hijo 5	206 / 210	159 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 6	210 / 214	159 / 159	168 / 168	220 / 220
	Hijo 7	206 / 206*	159 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 8	-----	-----	164 / 168	220 / 220
	Hijo 9	-----	159 / 159	164 / 168	220 / 220
	Hijo 10	206 / 210	159 / 165	139 / 168	220 / 220
	Hijo 11	206 / 206*	159 / 159	139 / 168	220 / 220
	Hijo 12	206 / 210	159 / 159	139 / 168	220 / 220
Hijo 13	210 / 214	159 / 159	164 / 168	220 / 220	
N° mínimo de genotipos paternos en cada locus		2	1	1	1
Familia 3	Madre	204 / 214	163 / 163	164 / 164	216 / 218
	Hijo 1	214 / 214	163 / 163	164 / 164	214 / 216
	Hijo 2	214 / 214	163 / 163	164 / 164	214 / 216
	Hijo 3	204 / 204	163 / 163	164 / 164	214 / 216
	Hijo 4	204 / 204	163 / 163	164 / 164	216 / 218
	Hijo 5	214 / 214	163 / 163	164 / 164	214 / 216
	Hijo 6	214 / 214	163 / 163	164 / 164	216 / 218
	Hijo 7	214 / 214	163 / 163	164 / 164	214 / 216
	Hijo 8	204 / 204	163 / 163	164 / 164	216 / 218
	Hijo 9	214 / 214	163 / 163	164 / 164	214 / 216
	Hijo 10	204 / 204	163 / 163	164 / 164	-----
N° mínimo de genotipos paternos en cada locus		1	1	1	1
Familia 4	Madre	210 / 214	159 / 163	139 / 168	216 / 218
	Hijo 1	210 / 210	159 / 163	139 / 168	216 / 218
	Hijo 2	210 / 210	163 / 163	139 / 168	218 / 220
	Hijo 3	214 / 214	159 / 161	139 / 168	216 / 218
	Hijo 4	210 / 210	163 / 163	139 / 168	218 / 220
	Hijo 5	210 / 210	159 / 161	168 / 168	216 / 218
	Hijo 6	210 / 214	159 / 161	139 / 168	216 / 218
	Hijo 7	214 / 214	159 / 161	139 / 168	218 / 220
	Hijo 8	214 / 214	159 / 161	139 / 168	216 / 218
	Hijo 9	210 / 214	159 / 163	139 / 168	216 / 218
	Hijo 10	210 / 210	159 / 161	168 / 168	216 / 218
Hijo 11	214 / 214	159 / 161	139 / 168	-----	
N° mínimo de genotipos paternos en cada locus		1	1	1	1

Tabla 4.4: Genotipos de la madre candidata y de los pichones de cada nido para cada locus. (*: genotipos de pichones que no se corresponden con el genotipo de la madre alegada). Las celdas sin datos corresponden a individuos que no exhibieron amplificación en ese locus luego de varios ensayos de PCR.

Como se observa en la tabla 4.4, en las familias 1, 3 y 4, el genotipo de la madre candidata resulta ser, en general, concordante con todos los genotipos de los pichones del nido correspondiente. Sin embargo, en la familia 2 en el *locus Clap 2*, se hallaron genotipos de tres pichones (214/214 y 206/206) no correspondientes a la madre candidata (210/210), lo cual puede ser atribuido a problemas metodológicos tales como una interpretación errónea de las bandas obtenidas o un error en la asignación de los huevos a las nidadas.

Además se determinaron 6 individuos con ausencias de bandas: en la familia 1: hijo 9 en el *locus Clap 6*; en la familia 2: hijos 4, 8 y 9 en el *locus Clap 2*, e hijo 8 en el *locus Clap 6*; y en la familia 4 en el hijo 11 en el *locus Clap 10*. Estos individuos no produjeron bandas en dichos *loci* luego de haber repetido los ensayos de amplificación y de corrida en geles varias veces, por lo cual no fueron incluidos en el análisis ya que su genotipo resultó incompleto con respecto a los 4 *loci* analizados. La ausencia de bandas en estos individuos puede ser interpretada por fallas en la amplificación de un determinado alelo por existencia de mutaciones (sustituciones, inserciones o deleciones) en el sitio de pegado del cebador utilizado en la reacción de PCR, que generalmente corresponden al extremo 3' del oligonucleótido (Pompanon *et al.*, 2005). En el caso de los microsatélites, el caso más común en la ausencia de bandas es la posesión de un alelo nulo en el *locus* para el cual no presenta amplificación (Paetkau y Strobeck, 1995).

A partir de los genotipos de la madre candidata y de los pichones, en cada *locus*, se pudo inferir y reconstruir el genotipo paterno (Método Mínimo Simple *Locus*). En la familia 1 fue asignado un mínimo de dos genotipos paternos para el *locus Clap 6*, debido a que el genotipo paterno debería poseer los alelos no aportados por el genotipo materno (161 y 163), además de alguno de los dos alelos maternos (159 o 165), ya que dos pichones poseen el mismo genotipo que la madre. En la familia 2, aún descartando los individuos que muestran un genotipo incompatible con el de la madre en el *locus Clap 2*, se debe considerar la existencia de dos genotipos paternos para explicar los genotipos de la

nidad ya que por vía paterna se aportarían tres alelos: 206, 210 y 214. En las familias 3 y 4 se observó un mínimo de un padre para cada *locus*.

Luego se emplearon programas informáticos (Gerud 2.0 y Cervus 3.0), los cuales, a diferencia del método Mínimo analizan en conjunto la información de los individuos en todos los *loci* estudiados como un conjunto.

Utilizando Gerud 2.0 se encontró que en tres de las cuatro familias analizadas, la madre candidata (la hembra al cuidado del nido) fue determinada como la madre compatible para todos los pichones. Sin embargo, en la familia 2 se comprobó la existencia de más de una madre compatible, datos que correspondieron a la inconsistencia hallada mediante el método Mínimo Simple *Locus*, por lo cual esta familia debió ser excluida del análisis de paternidad (Madre: 210/210, Hijo 3: 214/214, Hijos 7 y 11: 206/206).

En la familia 1, los pichones fueron asignados (es decir, correspondieron con alto grado de probabilidad), a dos padres como mínimo con un total de 64 arreglos posibles entre los alelos paternos, que aparecen combinados en grupos de a dos, mostrando un caso de paternidad doble. El programa da como resultado 50 grupos conteniendo a la madre y combinaciones de dos padres probables (Tabla F, Capítulo 6, Anexo, página 158). Por motivos de practicidad, se elaboró una tabla conteniendo los 5 grupos que mostraron los mayores valores de probabilidad (Tabla 4.5).

En la tabla 4.5 se observa el número de pichones asignados (correspondientes) con cada progenitor paterno dentro de cada grupo constituido por una hembra y dos machos. Por ejemplo en el grupo 1, del total de 15 pichones muestreados en la familia 1, 12 son asignados al primer padre con cierto valor de probabilidad, y de ese mismo total, 8 pichones fueron asignados al segundo padre con la misma probabilidad. Dicho valor de probabilidad se basó en la segregación de alelos paternos y su desvío de los valores esperados por herencia mendeliana, y fue calculada como la probabilidad binomial multiplicada a través de todos los genotipos maternos y paternos.

Grupos de Parentales	Genotipos Clau 2 - Clau 6- Clau 9- Clau 10	Nro. de pichones asignados	Probabilidad para cada padre
Grupo 1 Madre Padre 1 Padre 2	206/206 -159/165-139/168-220/220 206/206-163/161-139/166-220/214 206/206-161/159-168/168-220/214	12 8	7,395E-6 7,395E-6
Grupo 2 Madre Padre 1 Padre 2	206/206 -159/165-139/168-220/220 206/206-163/161-168/166-220/214 206/206-161/165-139/139-220/214	12 8	6,209E-6 6,209E-6
Grupo 3 Madre Padre 1 Padre 2	206/206 -159/165-139/168-220/220 206/206-163/161-139/166-220/214 206/206-163/159-168/168-220/214	12 6	4,989E-6 4,989E-6
Grupo 4 Madre Padre 1 Padre 2	206/206 -159/165-139/168-220/220 206/206-163/161-139/166-220/214 206/206-165/165-168/168-214/214	12 2	4,216E-6 4,216E-6
Grupo 5 Madre Padre 1 Padre 2	206/206 -159/165-139/168-220/220 206/206-163/161-139/166-220/214 206/206-159/159-168/168-214/214	12 2	4,216E-6 4,216E-6

Tabla 4.5: Grupos de parentales elaborados por el programa Gerud 2.0 para la familia 1. Se muestran sólo los 5 primeros grupos con mayores valores de probabilidad.

Como puede observarse en la tabla 4.5, los valores de probabilidad son muy bajos para cada grupo. El valor más bajo observado correspondió al grupo 50: 3,735E-8 (Tabla F, Capítulo 6, Anexo, página 158). Esto demuestra que existe una gran cantidad de combinaciones genotípicas posibles con valores de probabilidad similares entre sí.

En las familias 3 y 4, las nidadas fueron asignadas, cada una, a un padre como mínimo, con dos genotipos paternos igualmente probables (Tabla 4.6).

Familias	Grupos de parentales	Genotipos Clau 2	Genotipos Clau 6	Genotipos Clau 9	Genotipos Clau 10	Nro. de pichones asignados	
Familia 3	Grupo 1	Madre	204/214	163/163	164/164	216/218	9
		Padre 1	214/204	163/163	164/164	214/216	
	Grupo 2	Madre	204/214	163/163	164/164	216/218	9
		Padre 2	214/204	163/163	164/164	214/218	
Familia 4	Grupo 1	Madre	210/214	159/163	139/168	216/218	10
		Padre 1	210/214	163/161	168/168	218/220	
	Grupo 2	Madre	210/214	159/163	139/168	216/218	10
		Padre 2	210/214	163/161	168/168	216/220	

Tabla 4.6: Genotipo de la madre y genotipos probables del progenitor paterno de las familias 3 y 4. Los alelos diferenciales entre los genotipos paternos se muestran en color rojo.

Luego se utilizó el programa Cervus 3.0 para realizar un nuevo análisis de maternidad, considerando los genotipos de cada probable madre y de los pichones de cada nido, y se halló que las familias fueron exitosamente asignadas a la madre alegada. Solamente 6 (12.3%) de los 49 pichones evaluados debieron ser excluidos del análisis debido a que sus genotipos fueron determinados para menos de los cuatro *loci* en estudio: Familia 1: Hijo 9; Familia 2: Hijos 4, 8 y 9; Familia 3: Hijo 10; Familia 4: Hijo 11 (Tabla 4.4). Con este programa se hallaron las misma tres inconsistencias en los pares de genotipos madre-hijo, que se detectaron en el análisis del locus *Clau 2* en la familia 2 utilizando el Metodo Mínimo y el programa Gerud 2.0 (Madre: 210/210, Hijo 3: 214/214, Hijos 7 y 11: 206/206) (Tabla 4.4).

Además se utilizó el programa Cervus 3.0 para profundizar el análisis de la familia 1, en cuyos genotipos, empleando Gerud 2.0, se hallaron indicios de multipaternidad. Utilizando los genotipos de los cinco parentales que aparecieron con mayor frecuencia, reconstruidos por Gerud 2.0 para dicha familia, se aplicó Cervus 3.0, para establecer el número de pichones asignados a cada uno de estos genotipos parentales más probables (Tabla 4.7):

Padres probables	<i>Clau 2</i>	<i>Clau 6</i>	<i>Clau 9</i>	<i>Clau 10</i>	Nro. de pichones asignados
Padre 1	206 / 206	163 / 161	139 / 166	220 / 214	3
Padre 2	206 / 206	161 / 159	168 / 168	220 / 214	5
Padre 3	206 / 206	163 / 161	168 / 166	220 / 214	-
Padre 4	206 / 206	161 / 165	139 / 139	220 / 214	3
Padre 5	206 / 206	163 / 159	168 / 168	220 / 214	4

Tabla 4.7: Número de pichones asignados para cada genotipo paterno en la familia 1. Se consideraron los genotipos paternos más probables según el análisis del programa Gerud 2.0.

Como demuestra la Tabla 4.7, los genotipos de los padres más probables, tomados individualmente, explican pocos genotipos de la nidada correspondiente. En cambio, como se observó en la Tabla 4.5, los genotipos paternos combinados de a dos en “grupos de parentales”, logran mayores valores de asignación de los genotipos de los pichones. Estos primeros resultados aportan datos para ampliar estudios acerca del

comportamiento reproductivo de multipaternidad en esta especie, y como se sugiere en la familia 1, esta podría constituir un caso de múltiple paternidad.

4.4. Conclusiones generales del capítulo

- Se logró aplicar por primera vez el análisis de *loci* microsatélites en muestras de *C. latirostris* en la provincia de Santa Fe en Argentina.
- Los genotipos fueron exitosamente detectados utilizando geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Además, la mayoría de los alelos detectados en este trabajo correspondieron al rango de pesos moleculares establecido por Zucoloto *et al.* (2006). Los microsatélites empleados permitieron realizar una asignación de parentesco en las familias analizadas.
- A partir de los resultados del análisis de paternidad, se puede observar la existencia de más de un padre en al menos un nido de *C. latirostris*, cuyos genotipos fueron asignados con diferentes probabilidades. Esta conclusión se basa en los datos obtenidos mediante los tres métodos: el Método Mínimo, aunque no detecta paternidad múltiple en los casos en que existan machos con genotipos similares, halló evidencias de más de un padre en dos de los cuatro nidos; el programa Gerud 2.0 halló en la familia 1 un mínimo de dos padres, lo que fue corroborado utilizando el programa Cervus 3.0.
- Aunque el tamaño muestral fue pequeño, y el número de *loci* analizados fue bajo, se observó un posible comportamiento reproductivo de multipaternidad propuesto en la hipótesis, en concordancia con los datos de Davis *et al.* (2001) en *A. mississippiensis*, indicando que este comportamiento reproductivo puede ser una característica compartida por las especies de la Familia Alligatoridae.

4.5. Bibliografía citada

- Bassam, B.J.; Caetano-Anolles, G.; Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196:80-88.
- Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Elsey, R.M.; Brisbin Jr, I.L.; Rhodes, W.E.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2000. Genetic structure of six populations of American alligators: a microsatellite analysis. En: Grigg, G.; Seebacher, F.; Franklin, C.E. (Eds.). *Crocodylian Biology Evolution*. Surrey Beatty and sons, Chipping Norton, UK: 38-50.
- Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Elsey, R.M.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Molecular Ecology* 10:1011-1024.
- Davis, L.M., Glenn, T.C., Strickland, D.C., Guillette, L.J. Jr, Elsey, R.M., Rhodes, W.E., Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2002. Microsatellite DNA analysis support an east-west phylogeographic split of American alligator populations. *Journal of Experimental Zoology* 294 (4): 352-72.
- Decroocq, S. 2003. SSR: Microsatellites, répétition de séquences simples (Simple sequence repeats). En : Tagu, D. ; Moussard, D. (Eds.). *Principes des techniques de biologie moléculaire*. 2^e. édition revue et augmentée. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Dever, J.A.; Strauss, R.E.; Rainwater, T.R.; McMurry, S.T.; Densmore, L.R. 2002. Genetic Diversity, Population Subdivision, and Gene Flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* 2002:1078–1091.
- FitzSimmons, N.N.; Tanksley, S.; Forstner, M.R.J.; Louis, E.E.; Daglish, R.; Gratten, J.; Davis, S. 2000. Microsatellite markers for *Crocodylus*: new genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. En: Grigg, G.; Seebacher, F.; Franklin, C.E. (Eds.). *Crocodylian Biology Evolution*. Surrey Beatty and sons, Chipping Norton, UK: 51-57.

- Fitzsimmons, N.; Buchan, J.C.; Lam, P.V.; Polet, G.; Hung, T.T.; Thang, N.Q.; Gratten, J. 2002. Identification of purebred *Crocodylus siamensis* for reintroduction in Vietnam. *Journal of Experimental Zoology* 294 (4): 373-381.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Glenn, T.C.; Dessauer, H.C.; Braun, M.J. 1998. Characterization of microsatellite DNA loci in American Alligators. *Copeia* 1998: 591-601.
- Isberg, S.R.; Chen, Y.; Barker, S.G.; Moran, C. 2004a. Analysis of microsatellites and parentage testing in saltwater crocodiles. *Journal of Heredity* 95:445-449.
- Isberg, S.; Thomson, P.; Nicholas, F.; Barker, S.; Moran, C. 2004b. Farmed saltwater crocodile. A genetic improvement program. Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, Sydney, Australia.
- Jones, A.G. 2005. GERUD 2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* 5: 708-711.
- Lang, J.W. 1989. Social behavior. En: Ross, C.A. (Ed.) *Crocodiles and Alligators*. Facts on File, Inc, New York, USA: 102 -117.
- Levinson, G.; Gutman, G.A. 1987. Slipped- strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- Longmire, J.L.; Lewis, A.K.; Brown, N.C.; Buckingham, J.M.; Clark, L.M.; Jones, M.D.; Meincke, L.J.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Ray, F.A.; Wagner, R.P.; Moyzis, R.K. 1988. Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. *Genomics* 2: 14-24.
- Marshall, T.C.; Slate, J.; Kruuk, L.; Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- McVay, J.D.; Rodriguez, D.; Rainwater, T.R.; Dever, J.A.; Platt, S.G.; McMurry, S.T.; Forstner, M.R.J.; Densmore, L.D. 2008. Evidence of multiple paternity in Morelet's

- Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, inferred from microsatellite markers. *Journal of Experimental Zoology* 309 A: 643-648.
- Murray, M.G.; Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8: 4321-4325.
- Myers, E.M.; Zamudio, K.R. 2004. Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology* 13:1951-1963.
- Nunney, L. 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size *Evolution* 47: 1329-1341.
- Paetkau, D.; Strobeck, C. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology* 4: 519-520.
- Pompanon, F.; Bonin, A.; Bellemain, E.; Taberlet, P. 2005 Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6: 847-856.
- Schlötterer, C.; Pemberton, J. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. En: DeSalle, R.; Schierwater, B. (Eds.). *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhäuser, Boston, Berlin.
- Strand, M.; Prolla, T.A.; Liskay, R.M.; Petes, T.D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Sugg, D.W.; Chesser, R.K. 1994. Effective population size with multiple paternity. *Genetics* 137: 1147-1155.
- Tautz, D.C.; Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 832-837.
- Tourn, S.; Imhof, A.; Costa, A.L.; von Finck, M.C.; Larriera, A. 1993. Colecta de sangre y procesamiento de muestras en *Caiman latirostris* (Informe de avance). En: Larriera, A.; Imhof, A.; von Finck, M.C; Costa, A.L.; Tourn, S.C. (Eds.) *Memorias del IV Workshop sobre Conservación y Manejo del yacaré overo (Caiman latirostris)*. Fundación Banco Bica, Santa Fe, Argentina: 25-30.

- Verdade, L.M.; Zucoloto, R.B.; Coutinho, L.L. 2002. Microgeographic variation in *Caiman latirostris*. *Journal of Experimental Zoology* 294(4):387-96.
- Villela, P. M. S. 2004. Caracterização genética de populações de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), utilizando marcadores microssatélites. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Villela, P.M.S.; Coutinho, L.L.; Piña, C.I.; Verdade, L.M. 2008. Macrogeographic genetic variation in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Journal of Experimental Zoology* 309: 628-636.
- Wells, K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25: 666-693.
- Zippel, K.C.; Lillywhite, H.B.; Mladinich, C.R.J. 2003. Anatomy of the crocodylian spinal vein. *Journal of Morphology* 258: 327–335.
- Zucoloto, R.B.; Verdade, L.M.; Coutinho, L.L. 2002. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. *Journal of Experimental Zoology* 294:346–351.
- Zucoloto, R.B., Villela, P.M.S.; Verdade, L.M.; Coutinho, L.L. 2006. Cross-species microsatellite amplification in south american caimans (*Caiman* spp and *Paleosuchus palpebrosus*). *Genetics and Molecular Biology* 29:75-78.

Capítulo 5

DISCUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES



5.1. Análisis de Variabilidad

Los aligatóridos, grupo que incluye a la familia Alligatoridae y a taxones cercanos a ella (Norell *et al.*, 1994) se han hallado en el registro fósil desde finales del Cretácico (Brochu, 1999), entre 99.6 a 83.5 millones de años atrás. Sin embargo se han encontrado registros de la existencia de criaturas crocodiliformes desde el Triásico, entre 220 y 260 millones de años atrás (Clark, 1994; Kumar y Hedges, 1998), desde su divergencia con las aves (Janke y Arnason, 1997). A través del tiempo, el plan corporal general de estos reptiles se ha conservado, dando indicios de que ha sido exitoso en los ambientes que habitaron estos organismos. Esta morfología poco cambiante podría estar relacionada con la relativa estabilidad en los genomas de los cocodrilianos, ya establecida por Cohen y Gans en 1970 mediante análisis citogenéticos (Ray *et al.*, 2005).

En general, en los cocodrilianos, se han hallado valores relativamente bajos de variabilidad (Gartside *et al.*, 1976; Flint *et al.*, 2000; Glenn *et al.*, 2002; etc.), dependiendo de los grupos taxonómicos estudiados y de la metodología empleada. Los valores bajos de variación detectados fueron atribuidos por diversos autores a uno o a una combinación de factores. Entre ellos, se ha sugerido que la baja variación hallada puede deberse a **características intrínsecas de estas especies**, tales como gran tamaño, ectotermia, potencialmente largos períodos de vida, y muy pocos cambios en su morfología externa desde sus primeros registros (Gartside *et al.*, 1976). Su calidad de ectotermos puede asociarse con tasas de metabolismo bajas lo que podría ser causa de bajas tasas de mutación. El conjunto de estas características ha motivado su denominación de “fósiles vivientes”.

Además de las mencionadas causas históricas, no desarrolladas en esta tesis, que han producido la retención de un plan corporal en los cocodrilianos a través de tiempos geológicos, el estudio de poblaciones naturales de estos organismos ha mostrado, en general, una muy baja variabilidad genética y diferenciación entre poblaciones, debido tal vez a la **deriva genética**, ya que muchas poblaciones de cocodrilianos han sido

reducidas en tamaño experimentando cuellos de botella. Esto se ha explicado como resultado del efecto de la sobreexplotación a que se ha sometido a los cocodrilianos en general durante las décadas de 1950 y 1960 (Thorbjarnarson, 1999). Este también puede ser el caso de *C. latirostris*, cuyas poblaciones argentinas, antes del año 1997, se consideraban en riesgo de extinción, al estar catalogadas en el apéndice I de CITES. La presión de caza que ha soportado esta especie, sumada al efecto de las modificaciones y reducciones drásticas de su hábitat (canalizaciones de ríos, deforestación, incremento de áreas sembradas, etc.), pudieron haber generado cuellos de botella poblacionales disminuyendo su tamaño poblacional efectivo y provocando la pérdida de alelos por acción de la deriva genética. Al determinarse el aumento y recuperación numérica de las poblaciones en estos últimos años, debido a la instauración de planes de manejo y conservación, se podría considerar que las poblaciones actuales han crecido a partir de algunos pocos individuos sobrevivientes, que podrían evidenciar las consecuencias del efecto fundador.

También se consideró que los bajos niveles de variación en cocodrilianos en general podrían estar determinados por la **relativa estabilidad del ambiente** en que habitan (Gartside *et al.*, 1976), como una respuesta a presiones de selección direccional que favorecen ciertos genotipos (Baker y Stebbins, 1965; Levins, 1968; Gartside *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1980). En otras palabras, el bajo nivel de variabilidad genética podría representar un mecanismo de adaptación y especialización al habitar un nicho estrecho en un ambiente relativamente estable (Lawson *et al.*, 1989). Si la fijación de muchos genes se comprende como una respuesta a largos períodos de estabilidad ambiental, los altos niveles de homocigosis podrían ser ventajosos más que perjudiciales, puesto que podrían favorecer una óptima adaptación (Gartside *et al.*, 1976). Esto coincide con la hipótesis de Nevo (2001) quien estableció que las variables ambientales son determinantes de variación genética. En este caso, un ambiente poco variable podría favorecer la estabilidad genética de estos organismos. Aunque un colapso poblacional o un mecanismo genético podrían ser razones determinantes de baja heterogeneidad, la

selección natural direccional, favoreciendo ciertos genotipos adaptativos, podría ser considerada como el mecanismo más probable de la baja variación hallada.

C. latirostris es considerada una especie depredadora en las redes tróficas incluidas en ambientes relativamente estables, como son los humedales que habita. Estas son comunidades clímax con gran estabilidad a largo plazo, por lo que la constitución genética de *C. latirostris* puede reflejar largos períodos de estabilidad ambiental cuya consecuencia habría sido la fijación de muchos genes. La estabilidad de su nicho a largo plazo es consistente con la retención de una misma morfología externa en este grupo (Gartside et al., 1976).

La variación puede también reducirse mediante **sistemas genéticos particulares** como recombinación intracromosómica (*crossing over*) reducida y ciertos sistemas reproductivos tales como la endogamia y comportamientos que incluyen la presencia de machos dominantes con mayor éxito reproductivo (Gartside et al., 1976) que tienden a mantener baja diversidad.

5.1.1. Marcadores isoenzimáticos

En general se considera que la técnica de electroforesis de isoenzimas detecta baja variabilidad genética debido a diferentes causas, una de ellas es que típicamente detecta mutaciones que sólo resultan en la sustitución de un aminoácido por otro de carga diferente. Como se sabe 16 aminoácidos son neutros y solamente 4 están cargados, de esta manera se ha estimado que sólo 25 ó 27% de las sustituciones alélicas de aminoácidos serían detectados electroforéticamente. Dever et al. (2002) sugirieron además que la variabilidad genética detectada por esta metodología es una subestimación dado que sólo analiza genes estructurales no tomando en cuenta los posibles y tal vez más importantes cambios en los mecanismos de sus sistemas integrales de regulación. Además, las sustituciones de aminoácidos en proteínas enzimáticas podrían tener en muchos casos efectos selectivos, de modo que no se

ajustarían a los modelos de equilibrio entre mutación, deriva y migración postulados para *loci* neutros.

Los bajos valores de variabilidad ($P = 0$, $A = 1$, $H_o = 0$) obtenidos en este trabajo mediante electroforesis de isoenzimas en *C. latirostris* podrían atribuirse a errores de muestreo dado el bajo número de sistemas isoenzimáticos analizados. Sin embargo, resultados similares fueron obtenidos por otros autores, quienes analizaron numerosos sistemas isoenzimáticos en géneros relacionados. Por ejemplo, en *Alligator mississippiensis*, Gartside *et al.* (1976) estudiaron 49 sistemas isoenzimáticos, Adams *et al.* (1980) analizaron 48 *loci* y Menzies *et al.* (1979) estudiaron 44 *loci*. En *Crocodylus niloticus*, Lawson *et al.* (1989) estudiaron 28, Jurgens *et al.* (1994) 51, y Flint *et al.* (2000), 52 *loci* isoenzimáticos. En general (tabla 5.1) los valores de variabilidad obtenidos por estos autores son relativamente bajos. Los resultados obtenidos en esta tesis sobre *C. latirostris* así como por diferentes autores en otras especies de cocodrilos, podría sugerir que existen genes fuertemente seleccionados que responden eficientemente a las diferencias ambientales y cuya modificación no resultaría adaptativa, que exhiben baja variabilidad genética.

5.1.2. Marcadores RAPD

Como se comentó anteriormente, los marcadores RAPD, a diferencia de las isoenzimas, no corresponden a genes estructurales, sino que consisten en fragmentos no codificantes, de tamaño medio amplificados al azar a partir del ADN genómico. Estos marcadores serían selectivamente neutros y pueden representar una muestra amplia de los *loci* correspondientes al genoma en estudio. En este trabajo, los valores de variabilidad obtenidos mediante marcadores RAPD fueron más altos que los hallados con isoenzimas.

Parámetros contrastados	Valores obtenidos en este trabajo (Capítulo 2)	Valores hallados por otros autores
Heterocigosis (H_e)	Análisis de isoenzimas	
	Valor: 0	-Gartside <i>et al.</i> , (1976) ; Menzies <i>et al.</i> , (1979) y Adams <i>et al.</i> , (1980) en <i>Alligator mississippiensis</i> : Rango entre 0,009 y 0,034 -Lawson <i>et al.</i> , (1989); Jurgens <i>et al.</i> , (1994) y Flint <i>et al.</i> , (2000): en <i>Crocodylus niloticus</i> : Rango entre 0 y 0,042
	Análisis de RAPD	
	Rango entre: 0,13 y 0,242	-Porras Murillo <i>et al.</i> , (2008) en <i>Crocodylus acutus</i> Rango entre: 0,22 y 0,25
Porcentaje de loci polimórficos (P)	Análisis de isoenzimas	
	Valor: 0	-Gartside <i>et al.</i> , (1976) ; Menzies <i>et al.</i> , (1979) y Adams <i>et al.</i> , (1980) en <i>Alligator mississippiensis</i> : Rango entre 4, 5% y 19,1% -Lawson <i>et al.</i> , (1989) ; Jurgens <i>et al.</i> , (1994) y Flint <i>et al.</i> , (2000) en <i>Crocodylus niloticus</i> : Rango entre 0% y 17,4%
	Análisis de RAPD	
	Rango entre: 31,3% y 65,6%	-Wu <i>et al.</i> , (2002) en <i>Alligator sinensis</i> : Rango entre 3,11% y 10,88% -Porras Murillo <i>et al.</i> , (2008) en <i>Crocodylus acutus</i> : Rango entre 68,09% y 97,87%
Número promedio de alelos por locus (A)	Análisis de isoenzimas	
	Valor: 1	-Gartside <i>et al.</i> , (1976) ; Menzies <i>et al.</i> , (1979) y Adams <i>et al.</i> , (1980) en <i>Alligator mississippiensis</i> : Rango entre 1,07 y 1,19 -Lawson <i>et al.</i> , (1989) ; Jurgens <i>et al.</i> , (1994) y Flint <i>et al.</i> , (2000) : en <i>Crocodylus niloticus</i> : Rango entre 1,00 y 1,22
	Análisis de RAPD	
	Rango entre 1,3 y 1,7	Sin datos de otros autores

Tabla 5.1: Valores comparativos entre los parámetros de variabilidad obtenidos en este trabajo con los estimados por otros autores en especies relacionadas

La Tabla 5.1 muestra los valores comparativos entre los parámetros de variabilidad genética obtenidos en este trabajo utilizando la técnica de RAPD e isoenzimas con los hallados por otros autores en especies relacionadas:

Las estimaciones de variabilidad cuantificadas por los parámetros H_e , P y A , utilizando RAPD fueron más altas que los valores obtenidos usando análisis de isoenzimas (Gartside *et al.*, 1976; Menzies *et al.*, 1979; Lawson *et al.*, 1989; Flint *et al.*, 2000). Esto sería consistente con las limitaciones de la electroforesis de isoenzimas para detectar variabilidad y la hipótesis acerca de la existencia de genes estructurales fuertemente seleccionados, por lo cual su modificación no resultaría adaptativa, temática discutida en el apartado anterior.

Los valores de variabilidad obtenidos en este trabajo utilizando la técnica de RAPD son, en general, mayores a los valores hallados por otros autores en otros cocodrilianos. Analizando estos marcadores en geles de poliacrilamida, en esta tesis se obtuvieron mayores valores de polimorfismo (entre 31,3% y 65,5%) que en el trabajo de Wu *et al.* (2002), quienes hallaron 3,11% y 10,88% de polimorfismo en dos subpoblaciones de *Alligator sinensis*, empleando geles de agarosa. La discrepancia entre estos resultados puede ser parcialmente explicada por diferencias en el grado de resolución de los geles, debido a que los geles de poliacrilamida generalmente detectan mayor cantidad de bandas que los de agarosa, debido al menor tamaño del poro que posee el polímero de acrilamida (Stift *et al.*, 2003).

En comparación con los valores de polimorfismo obtenidos en este trabajo, Porras Murillo *et al.* (2008) detectaron mayores proporciones de *loci* polimórficos (entre 68,09% y 97,87%) analizando, mediante RAPD, poblaciones de *Crocodylus acutus*. Lamentablemente estos autores no explicitan en su trabajo el número de marcadores analizados, ni los métodos de estimación de los estadísticos.

El análisis de la distribución de la varianza realizado en esta tesis a partir de los datos de RAPD, mostró que la diversidad genética total (H_T) fue de 0.23, siendo su componente dentro de poblaciones $H_W = 0.16 \pm 0.03$, y la diversidad entre poblaciones $H_B = 0.06 \pm$

0.003. De estos resultados se desprende que la mayor parte de la diversidad genética (73%) se encuentra dentro de las poblaciones, mientras que la diversidad genética entre poblaciones es menor (27%) aunque significativa. Al analizar los componentes de la varianza de H_e , se halló que en su mayor parte (entre 65 y 80%) dicha varianza corresponde a variación entre *loci*, mientras que una parte minoritaria de dicha varianza se da entre individuos (entre 20 y 35%). Esto sugiere que aún con un bajo número de individuos muestreados, como en el presente trabajo, la probabilidad de pérdida de alelos para el análisis de variabilidad es baja.

Existen varias hipótesis, postuladas para los cocodrilos en general (ver página 125), que podrían explicar el patrón de variabilidad observado en las poblaciones de *C. latirostris* analizadas en este estudio: la deriva genética, la estructura del ambiente, y las características intrínsecas de la especie.

Entre los factores descritos como reductores de variabilidad, la deriva genética puede producir diferencias aleatorias en las frecuencias alélicas entre poblaciones, y este proceso podría explicar el valor altamente significativo estimado aquí para el valor de F_{ST} promedio (0.27 ± 0.08 , $P < 10^{-4}$) como para los valores de F_{ST} obtenidos entre pares de poblaciones. Los niveles de variabilidad genética en las poblaciones son el resultado de un balance entre la ganancia y la pérdida de polimorfismo: el polimorfismo puede reducirse rápidamente por efecto de la deriva genética si disminuye el tamaño de la población, como ocurrió con *C. latirostris*. La presión de caza que ha soportado esta especie, sumada a las intensas modificaciones de su hábitat, pueden haber generado cuellos de botella poblacionales disminuyendo su tamaño poblacional efectivo y provocando la pérdida de alelos por acción de la deriva genética. Otro efecto de la deriva genética es la producción de diferencias aleatorias en frecuencias alélicas entre poblaciones (Frankham *et al.*, 2002) que podría explicar de modo alternativo, la aparición de dos marcadores exclusivos en la población AES. Aunque la mayor parte de la diversidad hallada fue debida a variación dentro de las poblaciones, se observó regularmente que una población (AES) se diferenció de las demás, por su mayor

variabilidad y la presencia de dos marcadores exclusivos (A1-12 y A1-17). En esta diferenciación también puede tenerse en cuenta la estructura del ambiente en que habitan estas poblaciones, ya que las más semejantes genéticamente entre sí (EEE, CSA y EDP) comparten ambientes más estables en relación con el flujo hídrico (variable preponderante en el sistema de humedales), mientras que AES se halla en un ambiente de transición entre dos cuencas hídricas (ríos Paraná y Salado) con mayor nivel de disturbio ambiental, que podría contribuir a su diferenciación con respecto al resto de las poblaciones. Esta temática será ampliada en la sección 5.2.

Una explicación alternativa del patrón de variación observado no estaría basada en una alta tasa de pérdida de alelos sino por el contrario, en una baja tasa de ganancia de formas alélicas. La tasa de mutación difiere entre grupos taxonómicos y existen numerosas hipótesis que sugieren que diversas variables de la historia de vida de los organismos podrían estar influenciando dicha tasa: tiempo generacional, tiempo de vida, frecuencia reproductiva y tasa metabólica. Entre las hipótesis mencionadas, las dos más relevantes se refieren a diferencias en la tasa metabólica (Martin *et al.*, 1992) y diferencias en el tiempo generacional (Kohne, 1970). La primera se basa en que los animales pequeños con alta tasa de metabolismo tienen una mayor tasa de producción de metabolitos secundarios que dañan el ADN (como los radicales de oxígeno), y por ello tienen una mayor probabilidad de originar mutaciones por errores en la reparación con respecto a animales grandes, que poseen baja tasa metabólica. En los cocodrilos, incluyendo a *C. latirostris*, además de poseer gran tamaño corporal, su característica de ectotermos también disminuye sus valores de metabolismo, lo cual reduce la producción de metabolitos secundarios, influyendo en su menor tasa de mutación.

La segunda hipótesis asume que la mayoría de las mutaciones son el resultado de errores durante la replicación y no de fallas en la reparación del genoma, por lo cual, las especies que poseen tiempo generacional largo y una baja frecuencia reproductiva, llevan a cabo menos replications de ADN por unidad de tiempo y por lo tanto, tendrán menos posibilidades de sufrir errores de copiado (Kohne, 1970).

Además, las variables demográficas, como la tasa de crecimiento y el tamaño poblacional de una especie influyen en los niveles de polimorfismo hallados; las poblaciones grandes poseen una mayor probabilidad de mutaciones que las pequeñas, simplemente porque tienen más copias de un gen en donde la mutación puede ocurrir. Diferentes estudios han demostrado que diversas especies predatoras de niveles elevados en las redes tróficas, caracterizadas por poseer densidades y tasas de crecimiento poblacional bajas presentan bajos niveles de polimorfismo (Hoelzel y Dover, 1991; Murray *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 2003). Las características del yacaré overo que determinan su denominación de fósil viviente, como al resto de los cocodrilos, debido a su gran tamaño corporal, longevidad, ectotermia, baja tasa metabólica, frecuencia reproductiva baja y su status de predador elevado en las redes tróficas, mantendrían bajos tamaños poblacionales compatibles con la hipótesis descripta.

Las diferentes hipótesis mencionadas pueden explicar, en conjunto o en forma individual, el patrón de variabilidad característico hallado en las poblaciones analizadas de yacaré overo.

5.1.3. Caracteres morfométricos

El análisis jerárquico de varianza de los rasgos cuantitativos en este trabajo indicó, al igual que con RAPD, que la mayor parte de la varianza ocurre dentro de las poblaciones (entre nidos y residual), mientras que el menor componente es entre poblaciones. El análisis de varianza multivariado global (MANOVA) mostró diferencias significativas entre poblaciones, que no fueron halladas en los análisis ANOVA individuales. Estos resultados parecen sugerir que considerando rasgo por rasgo, las diferencias entre poblaciones son muy pequeñas, pero considerando todos los rasgos como un fenotipo global, estas diferencias podrían acumularse mostrando resultados significativos.

Los componentes de varianza estimados a través de REML (*Restricted Maximum Likelihood*) para los tres componentes principales, nuevamente mostraron mayores

niveles de varianza entre nidos que entre poblaciones. Aunque la diferenciación entre poblaciones con este método pareció ser relativamente baja, las comparaciones específicas de a pares revelaron diferencias significativas. Debido a que sólo el CP 2 y el CP 3 mostraron diferencias significativas en las comparaciones de a pares, se puede concluir que la diferenciación fenotípica está más relacionada con las diferencias en la forma corporal antes que con las diferencias en el tamaño del cuerpo.

Como únicos antecedentes de trabajos que analizan variabilidad morfológica en cocodrilianos con metodologías similares a la de este trabajo, se pueden citar los de Verdade (1997) y Wu *et al.* (2006). Ambos autores observaron que la variación morfológica fue baja en poblaciones en cautiverio de *C. latirostris* y de *Alligator sinensis* respectivamente. En el presente estudio se halló alta variación de las medidas morfométricas entre nidos, quizás debido al hecho de que los animales muestreados en este trabajo provienen de poblaciones silvestres.

El resto de los trabajos citados en la Introducción, referidos a morfometría en *C. latirostris*, se refiere a aspectos particulares de los ejemplares, tales como la correlación entre medidas de la hembra y las de sus pichones (Verdade, 2000), proporción entre medidas morfométricas a diferentes edades (Verdade, 2001) y diferenciación de las medidas morfométricas respecto del sexo de los individuos (Piña *et al.*, 2007).

El sexo de los individuos puede afectar la medida de rasgos de la cabeza en crías de *C. latirostris* (Piña *et al.*, 2007). Debido a este hecho, una considerable parte de la varianza hallada entre nidos de la misma población podría ser debida a la variable sexo. Lamentablemente en el presente estudio no pudo determinarse el sexo de los individuos debido a que el diagnóstico de dicho rasgo en las crías implica el sacrificio de los individuos muestreados, lo cual no fue posible ya que éstos formaban parte de los ejemplares de manejo por parte del Proyecto Yacaré.

Piña *et al.* (2007) en coincidencia con Verdade (2000), hallaron dimorfismo sexual en la región superior del cráneo en pichones y juveniles de *C. latirostris*, respectivamente. Los autores sugirieron que este hecho puede estar relacionado evolutivamente con el

sistema de reconocimiento del sexo a través de la visión, ya que los individuos exhiben sólo la parte superior de la cabeza por encima de la superficie al estar sumergidos en el agua. El hecho de que en el presente trabajo se observó que algunas medidas de la cabeza como WN (ancho máximo entre las narinas externas) e IOW (ancho mínimo interorbital), tienen importante influencia sobre la variabilidad morfológica, parece apoyar el rol importante de estos rasgos en comportamientos reproductivos y quizás también alimentarios.

Cualquiera sea el motivo de los valores de heterogeneidad hallados, la rápida recuperación de muchas poblaciones de cocodrilianos, incluidas las de *C. latirostris*, sugiere que los niveles de variabilidad existentes podrían ser compatibles con el mantenimiento y la expansión de poblaciones saludables en cortos períodos de tiempo (Chabreck, 1967).

Con los datos obtenidos en el presente trabajo se podría afirmar que los valores de variabilidad dependen en gran medida de la técnica de análisis empleada. Las comparaciones entre especies o poblaciones con datos de otros autores resultan muy difíciles de realizar, debido a la gran diversidad de métodos y parámetros utilizados. De todos modos, se puede concluir que los valores de variabilidad determinados para las poblaciones estudiadas aquí para *C. latirostris* pueden ser reconocidas por sus buenos niveles de viabilidad poblacional y capacidad reproductiva en los ambientes que habitan.

5.2. Estructura genético-poblacional

Las recomendaciones en el manejo genético de las poblaciones varían significativamente dependiendo de la estructura poblacional que éstas posean. Diferentes poblaciones de la misma especie localizadas en diferentes hábitats pueden existir total o parcialmente aisladas, constituyendo una población estructurada (es decir, un conjunto estable de demos semiaislados) o bien una metapoblación, es decir, un grupo de poblaciones parcialmente aisladas sujetas a extinciones y recolonizaciones locales. Esta

estructura depende del flujo génico existente y de las tasas de extinción poblacionales. Generalmente las poblaciones pequeñas y totalmente aisladas experimentan severos efectos de endogamia, que es una posible causa de extinción (Frankham *et al.*, 2002). Actualmente, la estimación de la estructura poblacional de las especies silvestres es realizada a partir de datos genéticos. En cocodrilianos existen escasos antecedentes de estudios relacionados con su estructura genético-poblacional.

5.2.1. Marcadores RAPD

Los valores de distancia genética obtenidos en este trabajo a través de la técnica de RAPD, fueron mucho mayores (entre 0,113 y 0,232) que los estimados por Wu *et al.* (2002), entre dos subpoblaciones de *A. sinensis* (0,00099). Estas diferencias podrían ser resultado de que los ejemplares analizados de *A. sinensis* forman parte de subpoblaciones mantenidas en cautiverio en granjas de cría, como estrategia de manejo y conservación de la especie. Contrariamente, los ejemplares de *C. latirostris* analizados en este trabajo provienen de poblaciones naturales, que en general, poseen valores más elevados de diversidad genética, debido a sus mayores posibilidades de cruzamiento al azar y mayores tamaños efectivos. Normalmente las poblaciones mantenidas en cautiverio durante cierto período de tiempo, experimentan efectos de endogamia debido al bajo número de individuos mantenidos como reproductores durante varias generaciones.

Tres de las cuatro poblaciones estudiadas en esta tesis (EEE, CSA, y EDP), mostraron valores muy bajos de distancia genética entre sí, (con un rango de D entre 0,113 y 0,140) (ver Capítulo 2, figura 2.9, página 67). En cambio, la población AES se mostró más alejada del resto de las poblaciones, con valores de distancia entre 0,164 y 0,232. El mismo patrón se observó en los resultados del análisis discriminante de correspondencia, donde nuevamente la población más diferenciada del resto fue AES (ver Capítulo 2, figura 2.10, página 68). La diferenciación de esta población con respecto

al resto se corresponde con la existencia, en ella de dos marcadores exclusivos, como se discutió en la sección 5.1. Estos resultados pueden relacionarse con el hecho de que las poblaciones de *C. latirostris* de las localidades de EEE, CSA y EDP, comparten ambientes relativamente estables mientras que la población AES ocupa un ambiente de transición que recibe flujo de agua y genes desde dos cuencas (ríos Paraná y Salado), y puede estar sujeta a mayores niveles de disturbios que pueden resultar en mayores valores de variabilidad genética.

La significativa diferenciación poblacional fue también observada a través del valor promedio estimado de F_{ST} (0.27 ± 0.08) que fue altamente significativo ($P < 10^{-4}$), así como a través de los altos valores de F_{ST} obtenidos entre todos los pares de poblaciones. Analizando estos índices, la población AES no parece diferenciarse significativamente de las demás poblaciones, probablemente debido a que todas estas poblaciones parecen estar muy diferenciadas entre sí, sugiriendo que el flujo génico es restringido entre todas ellas.

No se cuenta con datos acerca de los patrones de movimiento particulares de machos y hembras en yacaré overo. En el presente trabajo no se analizó por separado el flujo génico correspondiente a machos y a hembras, debido a que no se cuenta con marcadores genéticos específicos de cada sexo. El flujo génico entre las cuatro poblaciones analizadas en este trabajo fue bajo ($Nm = 0, 3$). En líneas generales, con valores de Nm menores a 1, la deriva genética actúa en forma casi independiente en cada población, por lo cual cada una puede divergir y diferenciarse de las demás (Slatkin, 1994). En este trabajo, la estimación de Nm no es precisa debido a que la estructura de estas poblaciones no se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia, por lo cual el flujo génico y la deriva genética no estarían en equilibrio como agentes de cambio en estas poblaciones. Sin embargo, puede aceptarse que el flujo génico entre estas poblaciones es bajo.

Los bajos valores de flujo génico estimados pueden deberse a las características reproductivas particulares de esta especie. Las hembras nidifican cada año en el mismo

lugar (Larriera, com. pers.), por lo cual, los patrones de movimiento de los adultos, al parecer, no están relacionados con la reproducción.

La estructura del hábitat en cada demo podría comportarse en ciertas situaciones como una limitante para el flujo génico, debido a que en épocas de sequía cada cuerpo de agua puede permanecer prácticamente aislado de otros. El comportamiento complejo de los niveles de agua, indudablemente, juega un rol fundamental en los niveles de flujo génico en estas poblaciones, verificándose escenarios donde los niveles elevados de agua pueden producir cierta homogeneidad entre las poblaciones, y los niveles bajos, cierto efecto de aislamiento. Dada dicha inestabilidad ecológica debida a las continuas inundaciones, sequías y modificaciones en las conexiones entre las poblaciones determinadas por el flujo hídrico, no se esperaría que la estructura de estas poblaciones ajustara al modelo de aislamiento por distancia. Coincidentemente, nuestros resultados muestran una falta de correlación significativa entre las distancias geográficas y genéticas ($Z=30.31$, $P= 0.61$ para distancias de Nei y $Z= 106.23$, $P= 0.69$ para estimas de a pares de los valores F_{ST}), por lo que se puede predecir que aún no se alcanzó el equilibrio entre migración, mutación y deriva genética entre estas poblaciones.

5.2.2 Caracteres morfométricos

Los estudios comparativos de diferenciación de poblaciones teniendo en cuenta datos genéticos y fenotípicos, se basan en la hipótesis de Wright (1969), de que el grado de diferenciación en los rasgos cuantitativos entre poblaciones, medido mediante el índice Q_{ST} (Spitze, 1993), es comparable al índice F_{ST} de Wright si los rasgos analizados fueran neutros. Las magnitudes relativas de estos dos índices, son por lo tanto informativas acerca del rol de la selección natural y de la deriva genética como agentes causales del grado de diferenciación poblacional observado (O'Hara y Merilä, 2005).

Utilizando rasgos morfométricos, en este trabajo, se observó que la mayor parte de la varianza en los rasgos se encuentra entre nidos antes que entre poblaciones, y los

valores de Q_{ST} obtenidos fueron 0 para siete del total de 11 rasgos estudiados, siendo distintos de 0 solamente en cuatro medidas de la cabeza (largo del techo craneal postorbital –LCR-, ancho de la base del hocico –SW-, ancho máximo entre las narinas externas –WN- y ancho mínimo interorbital –IOW-).

Los valores F_{ST} estimados en el presente trabajo son mayores (0.27 ± 0.08) que los de Q_{ST} , sugiriendo una mayor contribución de *loci* neutros que de *loci* adaptativos a la diferenciación entre poblaciones. Los rasgos cuantitativos probablemente se encuentren más relacionados con la aptitud relativa (o *fitness*), por lo que la diferenciación entre poblaciones resulta relativamente baja.

Con los datos recabados mediante análisis de morfometría en este trabajo se podría concluir que a pesar de los eventos pasados de sobreexplotación de las poblaciones de *C. latirostris*, que resultaron en reducción del tamaño poblacional (cuello de botella), la variabilidad genética ha permanecido relativamente elevada. Esta característica sumada a la existencia de una diferenciación significativa entre poblaciones, hace suponer que el bajo nivel de flujo génico (posiblemente en concordancia con los ciclos hídricos) mantiene una cierta diferenciación en poblaciones semi-aisladas. Esta situación, aunque dinámica y estacional, podría indicar que los planes de manejo implementados en la zona desde 1990, han producido resultados positivos en las poblaciones de *C. latirostris*, debido a que, además de haberse incrementado numéricamente, las poblaciones han mantenido su variación y características particulares. Estos datos deberían tenerse en cuenta en la evaluación de los actuales planes de manejo, además de en la implementación de nuevas estrategias de conservación para esta y otras especies asociadas.

5.3. Heredabilidad

La heredabilidad es uno de los conceptos centrales de la genética cuantitativa. En su forma más simple, es la proporción de la varianza fenotípica total en una población debida a las diferencias genéticas entre individuos. Más específicamente, la

heredabilidad es la proporción de la varianza fenotípica atribuible a variación genética que los padres pueden transmitir a sus hijos. Entonces, es la heredabilidad de un carácter en una población lo que determina su potencial evolutivo (Frankham *et al.*, 2002).

La heredabilidad es una propiedad de la población en relación con las características ambientales a las que están sujetos los individuos, y no solamente del carácter en que fue estimada. Puesto que el valor de la heredabilidad depende de la magnitud de todas las componentes de varianza, un cambio en cualquiera de éstas la afectará. En consecuencia, todas las componentes genéticas se encuentran influidas por las frecuencias génicas y pueden diferir de una población a otra de acuerdo con la historia de la población, es decir, con las condiciones de cría de los individuos. Las condiciones más variables en la crianza de los individuos reducen la heredabilidad mientras que las más uniformes la aumentan (Falconer, 1986). De este modo siempre que se mencione un valor para la heredabilidad de un carácter dado debe comprenderse que se refiere a una población particular que se desarrolla bajo condiciones particulares, como es el caso de las poblaciones analizadas en este trabajo.

Los valores de heredabilidad en sentido estricto resultaron altamente significativos en la mayoría de los rasgos en las poblaciones analizadas en esta tesis, aunque podrían estar sobreestimados, debido a que en este trabajo no se tuvo en cuenta efectos de dominancia, de epistasia, maternos y de ambiente común, los cuales incrementan la covarianza entre hermanos enteros (Lynch *et al.*, 1999). Sin embargo, como la mayoría de las diferencias entre nidos resultaron altamente significativas, se puede sugerir que existe una importante variabilidad genética.

Los rasgos TTL (largo total), SVL (largo a la cloaca) y BM (masa corporal), son generalmente tenidos en cuenta para medir el crecimiento de los animales para uso comercial en programas de cría. Debido a sus altos valores de heredabilidad estimados se espera que su respuesta a la selección direccional sea alta. Coincidentemente la alta variabilidad detectada para dichos rasgos indica su gran potencial para mejorarlos en planes de cría.

Aunque en nuestro país todos los emprendimientos comerciales de los productos de *C. latirostris* se basan en el sistema de *ranching*, el cual no incluye la utilización de progenitores en cautiverio, el crecimiento exponencial de la utilización sustentable de las especies de cocodrilos en general justifica el análisis integral de estas especies en sus aspectos biológicos (morfológicos, fisiológicos, reproductivos, etológicos, etc.), así como en sus aspectos ecológicos. Además, la información acerca de la heredabilidad de los caracteres morfológicos es potencialmente utilizable para el desarrollo de sistemas de criadero (*farming*), ya implementados en otros países como Brasil, y que próximamente comenzarán a desarrollarse experimentalmente en Argentina.

5.4. Análisis de paternidad

El conocimiento de las estrategias reproductivas es una importante contribución para la conservación de una especie. La paternidad múltiple se ha descrito en teoría como un agente que incrementa el tamaño efectivo poblacional (Sugg y Chesser, 1994), aumentando potencialmente la diversidad genética de aquellas poblaciones que han experimentado recientemente eventos de deriva genética, tales como cuellos de botella poblacionales (McVay *et al.*, 2008).

Mediante el análisis de paternidad realizado en esta tesis se detectó la existencia de más de un progenitor paterno en al menos uno de los nidos analizados. Aunque el tamaño muestral fue pequeño, en este trabajo se comprobaron indicios de paternidad múltiple, en concordancia con los previamente determinados por Davis *et al.* (2001) en *A. mississippiensis*, indicando que este comportamiento reproductivo podría ser una característica compartida por las especies de la Familia Alligatoridae.

Aunque no es sorprendente la presencia de poliandria en estas especies, los niveles hallados aparentemente son más altos que los inicialmente supuestos por Davis *et al.*

(2001), debido a que este comportamiento ha sido detectado en niveles de hasta un 50%, en estudios realizados en *Crocodylus moreletii* (McVay *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que el hallazgo de paternidad múltiple en los cocodrilianos podría ser resultado de múltiples cópulas en un solo período de apareamiento o bien, debido a la existencia de almacenamiento de esperma en las hembras entre un período reproductivo y otro. La capacidad de almacenamiento de esperma ha sido propuesta por Davenport en 1995 para *Paleosuchus palpebrosus* (perteneciente a la familia Alligatoridae al igual que *C. latirostris*), y recientemente fue hallada por Gist *et al.* (2008) en hembras de *A. mississippiensis*, las cuales podrían ser capaces de acumular esperma en las glándulas de sus oviductos por un período menor a un año. Este mecanismo podría ser una de las causas de la detección de multipaternidad en esa especie, ya que las hembras podrían copular con más de un macho en una misma estación reproductiva y acumular esperma, y por ello, su correspondiente nidada de ese año podría poseer más de un progenitor paterno. No existen registros en relación con este aspecto de la biología reproductiva en *C. latirostris*, pero el hallazgo de indicios de múltiple paternidad en este trabajo podría ser explicado mediante mecanismos similares que los descritos para sus especies emparentadas.

La pérdida de diversidad genética se ha asociado con un incremento en la vulnerabilidad de la población y con mayor riesgo de extinción (Lande y Shannon, 1996; Frankham, 2005). La paternidad múltiple como estrategia de apareamiento puede contribuir a aumentar la variabilidad genética a medida que las poblaciones se recuperan en número, debido a que este comportamiento produce un incremento en el tamaño efectivo poblacional (Sugg y Chesser, 1994).

Por esto es claro que el conocimiento de los sistemas de apareamiento es importante en el mantenimiento de poblaciones viables de especies objeto de uso sustentable, como es el caso de *C. latirostris*. Esta información es potencialmente útil, por ejemplo, para indicar la proporción de machos y hembras necesarios para la reintroducción en la

naturaleza, con el objetivo de maximizar el tamaño efectivo poblacional. Además, futuros estudios acerca del sistema de apareamiento, deberían emplear un marco de trabajo que integre datos etológicos y genéticos para efectivizar una mejor comprensión de la biología reproductiva de *C. latirostris*.

5.5. Consideraciones finales

Los datos recabados en el presente trabajo constituyen el primer aporte para el conocimiento genético del yacaré overo en nuestro país. Los resultados demostraron que las técnicas bioquímicas, moleculares y morfométricas empleadas fueron adecuadas para el logro de nuestros objetivos, ya que permitieron una aproximación al entendimiento de la variabilidad, estructura y flujo genéticos de las poblaciones estudiadas, además de posibilitar el inicio de estudios acerca de la heredabilidad de caracteres cuantitativos, y del sistema de apareamiento de esta especie.

El análisis genético-poblacional por medio de técnicas moleculares tal vez sea la parte más importante de la genética de la conservación, y actualmente resulta muy útil para el estudio de poblaciones explotadas comercialmente y/o sujetas a planes de conservación. Aunque de reconocida utilidad y de amplia aplicabilidad, los estudios moleculares no deben desplazar los análisis poblacionales realizados mediante estudios tradicionales, en áreas tales como morfología, citogenética, ecología, etología, etc.; sino, contrariamente, coordinar con dichas áreas para lograr un conocimiento biológico integral de nuestras especies regionales. Para lograr una mayor eficiencia en el uso de nuestros recursos naturales, se torna, además muy importante el adecuado desarrollo de pautas legales, y la aplicación eficaz de leyes para protección de la fauna.

Por ello, cuanto más profunda e integral resulte la comprensión sobre la biología de estas especies, más precisas y adecuadas serán las decisiones humanas que permitan su existencia continua en nuestros ambientes regionales.

5.6. Bibliografía citada

- Adams, S.E.; Smith, M.H.; Baccus, R. 1980. Biochemical variation in the american alligator (*Alligator mississippiensis*). *Herpetologica* 36 (4): 289-296.
- Baker, H.G.; Stebbins, G.L.(Eds.). 1965. The genetics of colonizing species. Academic Press. New York, USA.
- Brochu, C.A. 1999. Phylogenetics, taxonomy, and historical biogeography of Alligatoroidea. Society of Vertebrate Paleontology Memoir 6. *Journal of Vertebrate Paleontology*.19 (2): 9-100.
- Chabreck, R.H. 1967. The American alligator. Past, present and future. Proceedings of Annual Conference of Southeastern Association Game and Fish Commissioners 21: 554.
- Clark, J.M. 1994. Patterns of evolution in Mesozoic Crocodyliformes. Fraser, N.C.; Sues, H.D. (Eds.). In the Shadow of the Dinosaurs. Cambridge University Press, New York, USA: 84–97.
- Cohen, M.M.; Gans, C., 1970. The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetics* 9, 81–105.
- Davenport, M. 1995. Evidence of possible sperm storage in the Caiman, *Paleosuchus palpebrosus*. *Herpetological Review* 26 (1): 14-15.
- Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Eelsey, R.M.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Molecular Ecology* 10:1011-1024.
- Dever, J. A.; Strauss, R.E.; Rainwater, T.R.; McMurry, S.T.; Densmore, L.D. 2002. Genetic Diversity, Population Subdivision, and Gene Flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia*: 1078–1091.
- Falconer, D.S. 1986. Introducción a la Genética Cuantitativa. Compañía Editorial Continental S.A de de C.V., México, México.

- Flint, N. S.; van der Bank, F. H.; Grobler, J. P. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water S.A.* 26: 105-109.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.
- Gartside, D.F.; Dessauer, H.C.; Joanen, T. 1976. Genic homozygosity in an ancient reptile (*Alligator mississippiensis*). *Biochemical Genetics* 15:655-663.
- Gist, D.H.; Bagwill, A.; Lance, V.; Sever, D.M.; Elsey, R.M. 2008. Sperm storage in the oviduct of the American alligator. *Journal of Experimental Zoology* 309A: 581-587.
- Glenn, T.C.; Staton, J.L.; Vu, A.T.; Davis, L.M.; Alvarado Bremer, J.R.; Rhodes, W.E.; Brisbin Jr, L.; Sawyer, R.H. 2002. Low Mitochondrial DNA Variation among American Alligators and a Novel Non-Coding Region in Crocodylians. *Journal of Experimental Zoology* 294: 312–324.
- Hoelzel, A.R.; Dover, G.A. 1991. Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Journal of Heredity* 66: 191-195.
- Janke, A.; Arnason, U. 1997. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent Archosauria (birds and crocodiles). *Molecular Biology and Evolution* 14:1266–1272.
- Jurgens, A.; Kruger, J.; van der Bank, F.H. 1994. Allozyme variation in the Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*) from Southern Africa. *Crocodyles. Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. IUCN-The World Conservation Union, Gland Switzerland: 72- 76.
- Hendrickson, S.L.; Bleiweiss, R.; Matheus, J.C.; Silva de Matheus, L.; Jácome, N.L.; Pavez, E. 2003. Low genetic variability in the geographically widespread Andean Condor. *The Condor* 105: 1-12.

- Kohne, E. 1970. Evolution of higher-organism DNA. Quarterly Reviews of Biophysics 33: 327–375
- Kumar, S.; Hedges, S.B. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. Nature 392: 917–920.
- Lande, R.; Shannon, S. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. Evolution 50: 434-437.
- Lawson, R.; Kofron, C.P.; Dessauer, H.C. 1989. Allozyme variation in a natural population of the Nile Crocodile. American Zoologist 29: 863-871.
- Levins, R. 1968. Evolution in changing environments: some theoretical considerations. Princeton University Press. Princeton, N.J, USA.
- Lynch, M.; Pfrender, M.; Spitze, K.; Lehman, N.; Hicks, J.; Allen, D.; Latta, L.; Ottene, M.; Bogue, F.; Colbourne, J. 1999. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. Evolution 53:100-110.
- Martin, A. P.; Naylor, G.J.P.; Palumbi, S.R. 1992. Rate of mitochondrial DNA evolution is slow in sharks compared to mammals. Nature 357: 153–155.
- McVay, J.D.; Rodriguez, D.; Rainwater, T.R.; Dever, J.A.; Platt, S.G.; McMurry, S.T.; Forstner, M.R.J.; Densmore, L.D. 2008. Evidence of multiple paternity in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, inferred from microsatellite markers. Journal of Experimental Zoology 309 A: 643-648.
- Menzies, R.A.; Kushlan, J.; Dessauer, H.C. 1979. Low degree of genetic variability in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Isozyme Bulletin 12: 61.
- Murray, B.W.; Malik, S.; White, B.N. 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQB in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). Molecular Biology and Evolution 12: 582–593.
- Nevo, E. 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 6233-6240.

- Norell, M.A.; Clark, J.M.; Hutchison, J.H. 1994. The Late Cretaceous alligatoroid *Brachychampsia montana* (Crocodylia): new material and putative relationships. American Museum Novitates 3116: 1–26.
- O’Hara, R.B.; Merilä, J. 2005. Bias and precision in Q_{ST} estimates: problems and some solutions. Genetics 171:1331-1339.
- Piña, C.; Larriera, A.; Siroski, P.; Verdade, L.M. 2007. Cranial sexual discrimination in hatchling broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). Iheringia Série Zoologia 97:17-20.
- Porras Murillo, L.P.; Bolaños Montero, J.R.; Barr, B.R. 2008. Variación genética y flujo de genes entre poblaciones de *Crocodylus acutus* (Crocodylia: Crocodylidae) en tres ríos del Pacífico Central, Costa Rica. Revista de Biología Tropical 56 (3): 1471-1480.
- Ray, D.A.; Hedges, D. J.; Herke, S.W.; Fowlkes, J.D.; Barnes, E.W.; LaVie, D.K.; Goodwin, L.M.; Densmore, L. D.; Batzer, M.A. 2005. Chompy: An infestation of MITE-like repetitive elements in the crocodylian genome. Gene 362: 1-10.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. Ecological Genetics, Real LA (Ed.) Princeton University Press, Princeton, USA: 3-18.
- Spitze, K. 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. Genetics 135:367-374
- Stift, G.; Pachner, M.; Lelley, T. 2003. Comparison of RAPD fragment separation in agarose and polyacrylamide gel by studying *Cucurbita* species. Cucurbit Genetics Cooperative Reports 26: 62-65.
- Sugg, D.W.; Chesser, R.K. 1994. Effective population size with multiple paternity. Genetics 137: 1147-1155.
- Thorbjarnarson, J. 1999. Crocodile tears and skins: International trade, economic constraints and limits to the sustainable use of crocodylians. Conservation Biology 13: 465-470.
- Verdade, L.M. 1997. Morphometric analysis of the Broad-snout caiman (*Caiman*

latirostris): An assessment of individual's Clutch, Body size, Sex, Age, and Area of origin. Ph. D Dissertation, Univ. of Florida, Gainesville, Florida, USA.

Verdade, L.M. 2000. Regression equations between body and head measurements in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Revista Brasileira de Biologia* 60:469-482.

Verdade, L.M. 2001. Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Brazilian Journal of Biology* 61: 431-435.

Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations. II. The Theory of gene frequencies*, Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, USA.

Wu, X.B.; Wang, Y.Q.; Zhou, K.Y.; Zhu, W.Q.; Nie, J.S.; Wang, C.L.; Xie, W.S. 2002. Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biological Conservation* 106: 435-441.

Wu, X.B.; Xue, H.; Wu, L.S.; Zhu, J.L.; Wang, R.P. 2006. Regression analysis between body and head measurements of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) in the captive population. *Animal Biodiversity and Conservation* 29: 65- 71.

Capítulo 6

ANEXO



Frecuencias alélicas por población

Población: CLAT/A (EEE) (DS 1)

		Locus y tamaño muestral														
Alélos		A1-12 10	A1-16 10	A1-17 10	A1-18 10	A1-24 10	A3-03 10	A3-07 10	A5-14 10	A5-15 10	B4-19 10	B5-04 10	B5-07 10	B5-11 10	B5-14 10	B5-16 10
A		.000	.000	.000	1.000	.000	.000	1.000	.000	.350	.000	.100	1.000	.550	1.000	.350
B		1.000	1.000	1.000	.000	1.000	1.000	.000	1.000	.650	1.000	.900	.000	.450	.000	.650
H		.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.455	.000	.180	.000	.495	.000	.455
H(unb)		.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.479	.000	.189	.000	.521	.000	.479

		Locus y tamaño muestral													
Alélos		B5-17 10	B5-21 10	B5-24 10	B5-25 10	B5-27 10	B5-28 10	B5-30 10	B5-31 10	B5-32 10	B5-33 10	B5-34 10	B5-35 10	B5-37 10	B5-38 10
A		.000	1.000	.000	.550	.100	.000	1.000	.100	.350	.200	.200	1.000	.100	.200
B		1.000	.000	1.000	.450	.900	1.000	.000	.900	.650	.800	.800	.000	.900	.800
H		.000	.000	.000	.495	.180	.000	.000	.180	.455	.320	.320	.000	.180	.320
H(unb)		.000	.000	.000	.521	.189	.000	.000	.189	.479	.337	.337	.000	.189	.337

		Locus y tamaño muestral		
Alélos		B5-43 10	B7-05 10	B7-26 10
A		.100	.000	.000
B		.900	1.000	1.000
H		.180	.000	.000
H(unb)		.189	.000	.000

Tabla B: Frecuencias alélicas para cada población y para cada locus polimórfico (continúa en la página siguiente)

Población: CLAT/ B (CSA) (DS 2)

		Locus y tamaño muestral														
Al el os		A1- 12 10	A1- 16 10	A1- 17 10	A1- 18 10	A1- 24 10	A3- 03 10	A3- 07 10	A5- 14 10	A5- 15 10	B4- 19 10	B5- 04 10	B5- 07 10	B5- 11 10	B5- 14 10	B5- 16 10
A		.000	.000	.000	.350	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.450	.450	.000	.450	.300
B		1.000	1.000	1.000	.650	1.000	1.000	.000	1.000	1.000	1.000	.550	.550	1.000	.550	.700
H		.000	.000	.000	.455	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.495	.495	.000	.495	.420
H(unb)		.000	.000	.000	.479	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.521	.521	.000	.521	.442

		Locus y tamaño muestral													
Al el os		B5- 17 10	B5- 21 10	B5- 24 10	B5- 25 10	B5- 27 10	B5- 28 10	B5- 30 10	B5- 31 10	B5- 32 10	B5- 33 10	B5- 34 10	B5- 35 10	B5- 37 10	B5- 38 10
A		.450	1.000	.050	.000	.200	.000	1.000	.100	1.000	1.000	.450	1.000	.000	.000
B		.550	.000	.950	1.000	.800	1.000	.000	.900	.000	.000	.550	.000	1.000	1.000
H		.495	.000	.095	.000	.320	.000	.000	.180	.000	.000	.495	.000	.000	.000
H(unb)		.521	.000	.100	.000	.337	.000	.000	.189	.000	.000	.521	.000	.000	.000

		Locus y tamaño muestral		
Al el os		B5- 43 10	B7- 05 10	B7- 26 10
A		.000	.000	.000
B		1.000	1.000	1.000
H		.000	.000	.000
H(unb)		.000	.000	.000

Tabla B: Frecuencias alélicas para cada población y para cada locus polimórfico (continúa en la página siguiente)

Población: CLAT/ C (EDP) (DS 3)

		Locus y tamaño muestral														
Al el os		A1- 12 10	A1- 16 10	A1- 17 10	A1- 18 10	A1- 24 10	A3- 03 10	A3- 07 10	A5- 14 10	A5- 15 10	B4- 19 10	B5- 04 10	B5- 07 10	B5- 11 10	B5- 14 10	B5- 16 10
A		.000	.000	.000	.350	.000	.000	1.000	.000	.100	.000	.100	.150	.000	.650	.650
B		1.000	1.000	1.000	.650	1.000	1.000	.000	1.000	.900	1.000	.900	.850	1.000	.350	.350
H		.000	.000	.000	.455	.000	.000	.000	.000	.180	.000	.180	.255	.000	.455	.455
H(unb)		.000	.000	.000	.479	.000	.000	.000	.000	.189	.000	.189	.268	.000	.479	.479

		Locus y tamaño muestral													
Al el os		B5- 17 10	B5- 21 10	B5- 24 10	B5- 25 10	B5- 27 10	B5- 28 10	B5- 30 10	B5- 31 10	B5- 32 10	B5- 33 10	B5- 34 10	B5- 35 10	B5- 37 10	B5- 38 10
A		.150	.450	.000	.350	.150	.000	.550	.000	1.000	.000	.200	.000	.050	.000
B		.850	.550	1.000	.650	.850	1.000	.450	1.000	.000	1.000	.800	1.000	.950	1.000
H		.255	.495	.000	.455	.255	.000	.495	.000	.000	.000	.320	.000	.095	.000
H(unb)		.268	.521	.000	.479	.268	.000	.521	.000	.000	.000	.337	.000	.100	.000

		Locus y tamaño muestral		
Al el os		B5- 43 10	B7- 05 10	B7- 26 10
A		.000	.000	.000
B		1.000	1.000	1.000
H		.000	.000	.000
H(unb)		.000	.000	.000

Tabla B: Frecuencias alélicas para cada población y para cada locus polimórfico (continúa en la página siguiente)

Población: CLAT/ D (AES)		(DS 4)														
		Locus y tamaño muestral														
Al el os		A1- 12 10	A1- 16 10	A1- 17 10	A1- 18 10	A1- 24 10	A3- 03 10	A3- 07 10	A5- 14 10	A5- 15 10	B4- 19 10	B5- 04 10	B5- 07 10	B5- 11 10	B5- 14 10	B5- 16 10
A		1. 000	. 150	1. 000	1. 000	. 150	. 200	. 650	. 200	. 150	. 200	. 000	. 450	. 450	. 650	1. 000
B		. 000	. 850	. 000	. 000	. 850	. 800	. 350	. 800	. 850	. 800	1. 000	. 550	. 550	. 350	. 000
H		. 000	. 255	. 000	. 000	. 255	. 320	. 455	. 320	. 255	. 320	. 000	. 495	. 495	. 455	. 000
H(unb)		. 000	. 268	. 000	. 000	. 268	. 337	. 479	. 337	. 268	. 337	. 000	. 521	. 521	. 479	. 000

		Locus y tamaño muestral													
Al el os		B5- 17 10	B5- 21 10	B5- 24 10	B5- 25 10	B5- 27 10	B5- 28 10	B5- 30 10	B5- 31 10	B5- 32 10	B5- 33 10	B5- 34 10	B5- 35 10	B5- 37 10	B5- 38 10
A		. 350	1. 000	. 000	. 050	. 200	. 150	. 450	. 000	. 450	. 450	. 200	. 050	. 000	. 000
B		. 650	. 000	1. 000	. 950	. 800	. 850	. 550	1. 000	. 550	. 550	. 800	. 950	1. 000	1. 000
H		. 455	. 000	. 000	. 095	. 320	. 255	. 495	. 000	. 495	. 495	. 320	. 095	. 000	. 000
H(unb)		. 479	. 000	. 000	. 100	. 337	. 268	. 521	. 000	. 521	. 521	. 337	. 100	. 000	. 000

		Locus y tamaño muestral		
Al el os		B5- 43 10	B7- 05 10	B7- 26 10
A		. 000	. 350	. 150
B		1. 000	. 650	. 850
H		. 000	. 455	. 255
H(unb)		. 000	. 479	. 268

Tabla B: Frecuencias alélicas para cada población y para cada locus polimórfico

Individuos	Eje 1	Eje 2	Eje 3
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
A	-0,8199	1,2634	-0,7081
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
B	1,5706	-0,2350	-0,8255
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
C	-1,1445	-1,7901	-0,4566
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406
D	0,1361	0,1042	1,4406

Tabla C: Coordenadas de los individuos en cada uno de los tres ejes canónicos más informativos en el análisis discriminante de correspondencia realizado con los marcadores RAPD

<i>Loci</i>	Eje1	Eje 2	Eje 3
A1.12	0,8495060	0,8142560	5,9977353
A1.16	0,8448923	-0,8931161	4,2574935
A1.17	0,8495060	0,8142560	5,9977353
A1.18	-1,4917982	-0,1054031	0,1891701
A1.24	3,0805620	7,9901108	1,3787643
A3.03	0,6714151	-5,4478521	4,6801326
A3.07	-1,2508809	-1,8273047	-0,8697904
A5.14	-0,0401483	-1,0316626	8,8894688
A5.15	-7,1659358	1,2153828	-0,8963258
B4.19	0,6714151	-5,4478521	4,6801326
B5.04	1,7907850	-0,2461698	-2,3777218
B5.07	-1,2438200	3,4146682	-1,1934252
B5.11	-5,1787341	14,8456400	0,6069225
B5.14	-1,3143345	-1,0456645	-0,3254141
B5.16	-5,3902012	-4,6617160	0,7903957
B5.17	1,6557521	-4,1123507	-0,0494904
B5.21	4,1386238	-0,4100968	-0,5188608
B5.24	-2,8772089	2,4045504	-1,1972335
B5.25	-6,5940396	-2,4206181	-1,0582887
B5.27	-3,4304926	2,7730465	0,9615235
B5.28	0,8448923	-0,8931161	4,2574935
B5.30	3,2973988	-0,1740660	-1,2965670
B5.31	4,0836081	6,8312899	-2,8131544
B5.32	-0,5509031	-3,6759263	-0,5637355
B5.33	9,7615202	-0,7446864	0,3587456
B5.34	-0,5665565	-6,7294777	-0,4820688
B5.35	6,5602970	9,9583094	-3,5494979
B5.37	-1,3985591	-4,0067934	0,7894284
B5.38	-9,6098398	0,4480158	-0,1698891
B5.43	-8,9315945	10,9120194	1,0524872
B7.05	1,7391602	2,6601747	3,1060018
B7.26	3,0805620	7,9901108	1,3787643

Tabla D: Carga o “peso” de cada marcador RAPD sobre cada uno de los ejes más informativos del análisis discriminante de correspondencia

<i>Locí</i>	Coseno Eje 1	Coseno Eje 2	Coseno Eje 3	Calidad
A1.17	0,093436	0,071534	0,989280	0,9925
A1.12	0,093436	0,071534	0,989280	0,9925
B5.35	0,403200	0,543818	-0,645511	0,8750
A3.07	-0,206837	-0,492435	-0,608234	0,6552
B5.11	-0,314647	0,629301	0,337041	0,6086
B5.33	0,736697	0,192814	0,023811	0,5805
B5.32	0,023758	-0,653488	-0,306169	0,5214
B5.25	-0,612152	-0,019767	-0,257052	0,4412
B7.05	0,059809	0,045790	0,633251	0,4067
A5.14	0,059062	0,045218	0,625343	0,3966
B5.04	0,380116	-0,145156	-0,436205	0,3558
B5.30	-0,042837	-0,203508	-0,548024	0,3436
B5.38	-0,287454	0,442981	-0,248271	0,3405
B4.19	0,054626	0,041822	0,578376	0,3393
A3.03	0,054626	0,041822	0,578376	0,3393
B5.14	-0,383225	-0,256105	-0,325202	0,3182
B5.16	-0,312338	-0,450530	0,099828	0,3105
B5.17	0,413371	-0,325754	0,002719	0,2770
A5.15	-0,404544	0,245476	-0,133024	0,2416
A1.16	0,044015	0,033697	0,466019	0,2202
B5.28	0,044015	0,033697	0,466019	0,2202
B5.07	0,018139	0,366000	-0,239006	0,1914
B5.43	-0,197288	0,304031	-0,170395	0,1604
B7.26	0,036568	0,027996	0,387172	0,1520
A1.24	0,036568	0,027996	0,387172	0,1520
B5.21	0,070600	-0,099269	-0,340158	0,1305
B5.31	0,125371	0,171744	-0,256102	0,1108
B5.37	-0,263583	0,069751	-0,177301	0,1058
B5.34	0,188481	-0,159522	-0,159728	0,0865
A1.18	-0,252997	0,090151	-0,021768	0,0726
B5.24	0,230326	-0,034459	-0,121061	0,0689
B5.27	0,098699	-0,170419	0,058222	0,0422

Tabla E: Valores de los cosenos y calidad (suma de los cosenos al cuadrado) para cada *locus* polimórfico analizados con RAPD, en cada uno de los tres ejes que resultaron más informativos en el análisis discriminante de correspondencia. Los valores en rojo destacan los *loci* con mayor calidad estimada, es decir que son más informativos para el lote de individuos analizados.

Grupos de Padres	Genotipos Clap2	Genotipos Clap6	Genotipos Clap9	Genotipos Clap10	Nro. de Hijos asignados	Probabilidad para cada padre
Grupo 1:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	7,40E-06
Padre 2	206/206	161/159	168/168	220/214	8	7,40E-06
Grupo 2:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	6,21E-06
Padre 2	206/206	161/165	139/139	220/214	8	6,21E-06
Grupo 3:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	4,99E-06
Padre 2	206/206	163/159	168/168	220/214	6	4,99E-06
Grupo 4:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	4,22E-06
Padre 2	206/206	165/165	168/168	214/214	2	4,22E-06
Grupo 5:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	4,22E-06
Padre 2	206/206	159/159	168/168	214/214	2	4,22E-06
Grupo 6:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	2,93E-06
Padre 2	206/206	163/165	168/168	214/214	3	2,93E-06
Grupo 7:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	2,28E-06
Padre 2	206/206	161/165	168/168	220/214	8	2,28E-06
Grupo 8:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,90E-06
Padre 2	206/206	163/165	168/168	220/214	6	1,90E-06
Grupo 9:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/165	168/166	220/214	7	1,23E-06
Padre 2	206/206	161/161	139/166	220/214	7	1,23E-06
Grupo 10:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/165	139/166	220/214	7	1,23E-06
Padre 2	206/206	161/161	168/166	220/214	7	1,23E-06
Grupo 11:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/159	168/166	220/214	7	1,23E-06
Padre 2	206/206	161/161	139/166	220/214	7	1,23E-06
Grupo 12:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/159	139/166	220/214	7	1,23E-06
Padre 2	206/206	161/161	168/166	220/214	7	1,23E-06

Tabla F: Grupos de posibles parentales elaborados por el programa Gerud 2.0 para los pichones correspondientes a la familia 1 a partir de sus genotipos, y el de su madre probable, determinados en cuatro *loci* microsatélites (continúa en la página siguiente)

Grupo 13:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,05E-06
Padre 2	206/206	161/165	168/168	214/214	4	1,05E-06
Grupo 14:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,05E-06
Padre 2	206/206	161/159	168/168	214/214	4	1,05E-06
Grupo 15:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,05E-06
Padre 2	206/206	163/159	168/168	214/214	3	1,05E-06
Grupo 16:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	7,45E-07
Padre 2	206/206	161/165	139/139	214/214	4	7,45E-07
Grupo 17:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	6,34E-07
Padre 2	206/206	163/165	139/139	220/214	6	6,34E-07
Grupo 18:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	6,34E-07
Padre 2	206/206	163/159	139/139	220/214	6	6,34E-07
Grupo 19:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	5,59E-07
Padre 2	206/206	161/159	139/139	220/214	8	5,59E-07
Grupo 20:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	5,32E-07
Padre 2	206/206	163/165	139/139	214/214	3	5,32E-07
Grupo 21:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	5,32E-07
Padre 2	206/206	163/159	139/139	214/214	3	5,32E-07
Grupo 22:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	5,12E-07
Padre 2	206/206	161/165	168/166	214/214	5	5,12E-07
Grupo 23:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	5,12E-07
Padre 2	206/206	161/159	168/166	214/214	5	5,12E-07
Grupo 24:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	3,90E-07
Padre 2	206/206	161/159	139/139	220/214	8	3,90E-07
Grupo 25:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	3,84E-07
Padre 2	206/206	161/159	168/166	220/214	9	3,84E-07

Tabla F (continúa en la página siguiente)

Grupo 26:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	3,83E-07
Padre 2	206/206	165/165	139/139	214/214	2	3,83E-07
Grupo 27:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	3,83E-07
Padre 2	206/206	159/159	139/139	214/214	2	3,83E-07
Grupo 28:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	3,83E-07
Padre 2	206/206	165/165	139/139	214/214	2	3,83E-07
Grupo 29:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	3,83E-07
Padre 2	206/206	159/159	139/139	214/214	2	3,83E-07
Grupo 30:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	3,33E-07
Padre 2	206/206	161/165	168/166	220/214	9	3,33E-07
Grupo 31:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	2,91E-07
Padre 2	206/206	161/159	139/166	220/214	9	2,91E-07
Grupo 32:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	2,75E-07
Padre 2	206/206	163/159	168/166	220/214	7	2,75E-07
Grupo 33:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/163	168/166	220/214	5	2,50E-07
Padre 2	206/206	161/165	139/166	220/214	9	2,50E-07
Grupo 34:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/163	168/166	220/214	5	2,50E-07
Padre 2	206/206	161/159	139/166	220/214	9	2,50E-07
Grupo 35:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,86E-07
Padre 2	206/206	161/165	139/139	214/214	4	1,86E-07
Grupo 36:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,86E-07
Padre 2	206/206	161/159	139/139	214/214	4	1,86E-07
Grupo 37:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,51E-07
Padre 2	206/206	163/159	139/139	220/214	6	1,51E-07
Grupo 38:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,33E-07
Padre 2	206/206	163/159	139/139	214/214	3	1,33E-07

Tabla F (continúa en la página siguiente)

Grupo 39:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	1,21E-07
Padre 2	206/206	161/165	139/166	220/214	9	1,21E-07
Grupo 40:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	1,21E-07
Padre 2	206/206	161/165	139/139	220/214	8	1,21E-07
Grupo 41:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	9,58E-08
Padre 2	206/206	161/159	139/139	214/214	4	9,58E-08
Grupo 42:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	9,58E-08
Padre 2	206/206	163/165	139/139	214/214	3	9,58E-08
Grupo 43:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	9,32E-08
Padre 2	206/206	161/165	139/166	214/214	5	9,32E-08
Grupo 44:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	168/166	220/214	12	9,32E-08
Padre 2	206/206	161/159	139/166	214/214	5	9,32E-08
Grupo 45:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/163	139/166	220/214	5	8,32E-08
Padre 2	206/206	161/165	168/166	220/214	9	8,32E-08
Grupo 46:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/163	139/166	220/214	5	8,32E-08
Padre 2	206/206	161/159	168/166	220/214	9	8,32E-08
Grupo 47:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	8,24E-08
Padre 2	206/206	163/165	168/166	220/214	7	8,24E-08
Grupo 48:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/161	139/166	220/214	12	5,76E-08
Padre 2	206/206	163/165	139/139	220/214	6	5,76E-08
Grupo 49:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/165	139/166	220/214	7	3,74E-08
Padre 2	206/206	161/161	139/166	220/214	7	3,74E-08
Grupo 50:						
Madre	206/206	159/165	139/168	220/220		
Padre 1	206/206	163/159	139/166	220/214	7	3,74E-08
Padre 2	206/206	161/161	139/166	220/214	7	3,74E-08

Tabla F: Grupos de posibles parentales elaborados por el programa Gerud 2.0 para los pichones correspondientes a la familia 1 a partir de sus genotipos, y el de su madre probable, determinados en cuatro *loci* microsatélites

6.2. Publicaciones

- 1- Amavet, P.; Markariani, R.; Fenocchio, A. 2003. **“Comparative Cytogenetic Analysis of the South American Alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina”**. *Caryologia* 56 (4): 489-493.

- 2- Amavet, P.S; Rosso, E.L.; Markariani, R.M.; Larriera, A. 2007. **“Analysis of the population structure of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) in Santa Fe, Argentina, using the RAPD technique.”** *Journal of Herpetology* 41 (2): 285-295.

- 3- Amavet, P.; Rosso, E.; Markariani, R.; Piña, C.I. 2008. **“Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina.”** *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecology Genetics and Physiology* 309A: 637-642.

- 4- Amavet, P.; Rosso, E.L.; Markariani, R.M.; Larriera, A. 2008. **“Estudios genético-poblacionales de *Caiman latirostris* (Reptilia, Alligatoridae) en Santa Fe, Argentina: una revisión a través del tiempo.”** *Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino*. Coordinador: F.G. Aceñolaza. INSUGEO, Tucumán, Argentina: 211-217. 258 p.

- 5-Amavet, P; Vilardi, J.C.; Rosso, E.; Saidman, B. 2009. **“Genetic and morphometric variability in *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman), Reptilia, Alligatoridae”**. *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecology Genetics and Physiology* 311A: 258-269.

6.3. Cursos acreditados para la carrera de Doctorado

-“Evolución cromosómica”- Dictado por: Dr. Claudio Bidau en la Fac. de Cs. Exactas, Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste en mayo de 1999 – Carga horaria: 48 hs. **2 puntos**.

-“Uso de técnicas moleculares en Sistemática”- Dictado por: Dra. Noemí Gardenal y colaboradores en la Fac. de Cs. Exactas, Fcas. y Nat. de la Univ. Nac. de Córdoba en junio de 2002- Carga horaria: 50 hs. **2 puntos**.

-“Nuevas metodologías para el análisis de DNA”-Dictado por: Dra. María Isabel Pividori en la Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Univ. Nac. del Litoral en abril de 2003- Carga horaria: 30 hs. **1 punto**.

-“Estadística para la investigación Científica”-Dictado por: Lic. Elena F. de Carrera y colaboradores, en la Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Univ. Nac. del Litoral en septiembre a noviembre de 2004- Carga horaria: 45 hs. **2 puntos**.

-“Técnicas electroforéticas: Fundamentos y Aplicaciones”-Dictado por: Docentes de la UBA en la Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Univ. Nac. del Litoral en octubre de 2005- Carga horaria: 35 hs. **1 punto**.

-“Genética II” –Dictada por Dra. Lidia Poggio y colaboradores, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Univ. de Buenos Aires en el 1er. Cuatrimestre de 2005- Carga horaria: 14 hs. semanales durante 15 semanas. **5 puntos**.

-“Genética de Poblaciones” –Dictada por el Dr. Juan César Vilardi y colaboradores, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Univ. de Buenos Aires en el 1er. Cuatrimestre de 2005- Carga horaria: 14 hs. semanales durante 15 semanas. **5 puntos.**

-“Estadística Aplicada a la Biología y Ciencias de la Salud”- Dictado por: Lic. Elena F. de Carrera y colaboradores, en la Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Univ. Nac. del Litoral en octubre y noviembre de 2006- Carga horaria: 60 hs. **2 puntos.**

Total: 20 puntos