

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GÉNERO *CROCODYLUS* (CROCODYLIA: CROCODYLIDAE) EN CUBA MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES NUCLEARES Y MITOCONDRIALES

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Facultad de Biología, UH

AUTORES PRINCIPALES: Yoamel Milián García¹ (22%), Georgina Espinosa López¹ (11%) y Michael A. Russello² (11%)

OTROS AUTORES: Etiam Pérez Fleitas³ (7%), Gustavo Sosa Rodríguez³ (7%), Leiter Guerra Manchena³ (7%), Manuel Alonso Tabet³ (5%), Roberto Ramos Targarona³ (5%), Roberto Soberón Rodríguez³ (5%), Lisandra Benítez Álvarez^{1e} (5%), Sonia Seuc Álvarez^{1e} (5%), Sheila Ribalta Mena^{1e} (5%), Jessica Castellanos Labarcena^{1e} (5%)

COLABORADORES: George Amato, John Thorbjarnarson, Axel Janke

ENTIDADES EJECUTORAS PARTICIPANTES:

¹ Facultad de Biología Universidad de La Habana

^{1e} Estudiantes de la Facultad de Biología Universidad de La Habana, que realizaron sus trabajos de diploma en este proyecto.

² Universidad de British Columbia, Canadá

³ Empresa para la Protección de la Flora y la Fauna

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Yoamel Milián García

Calle 25 #455 entre J e I. Vedado, Plaza de la Revolución. CP: 10400.

Email: yoamel@fbio.uh.cu; yoamelmg@gmail.com

RESUMEN:

Entre los crocodylianos del Nuevo Mundo, *Crocodylus rhombifer* presenta la menor distribución natural y es además uno de los más amenazados. Esta especie endémica coexiste en Cuba con el cocodrilo americano (*C. acutus*), el segundo miembro del género que habita en la isla. Ambas especies se hibridan, tanto en poblaciones naturales como en cautiverio. El presente estudio se centra en la caracterización genética de poblaciones de *Crocodylus* que habitan en Cuba, mediante el empleo de marcadores nucleares y mitocondriales. Un total de 329 individuos provenientes de las ciénagas de Zapata y Birama se incluyeron en el estudio. El grado de hibridación interespecífico estimado a partir de nueve *loci* microsatélites resultó ser elevado y subestimado, tanto en el medio natural (49,1%), como en cautiverio (16,1%). El análisis del polimorfismo del ADNmt aportó evidencias de hibridación bidireccional entre *C. rhombifer* y *C. acutus* en su medio natural. Por otro lado, reveló una acentuada variación intraespecífica para *C. acutus* en contraste con una falta de diferenciación genética a este nivel entre las entidades morfológicas *C. rhombifer* y *C. acutus* que habitan en

Cuba. Adicionalmente, se obtuvo evidencia de paternidad múltiple en el 100% de los nidos de *C. rhombifer* muestreados en cautiverio.

COMUNICACIÓN CORTA

El orden Crocodylia está representado en la actualidad por 24 especies, distribuidas en tres familias y nueve géneros, el 50% de las cuales pertenecen al género *Crocodylus*. Cuatro de las 12 especies reconocidas dentro de este género, habitan en el continente americano, y de ellas dos comparten su hábitat en la mayor isla del Caribe. Conocidos por sus nombres comunes como cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*) y cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), estos carismáticos miembros de la herpetofauna cubana poseen la menor y mayor distribución geográfica reconocida para *Crocodylus* del Nuevo Mundo, respectivamente. De igual manera aparecen en los extremos de las categorías de amenazas registradas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), para *Crocodylus* del continente americano (En Peligro Crítico de Extinción y Vulnerable), siendo el endémico *C. rhombifer* la especie más amenazada ([IUCN 2015](#)).

Dado el estatus crítico de conservación observado en *C. rhombifer* ([IUCN 2015](#)), una mayor comprensión de la estructura genética poblacional, grado de hibridación con *C. acutus*, tanto *in situ* como *ex situ* así como la inferencia de posibles patrones de paternidad múltiple *ex situ* son necesarios para una evaluación completa de su estado de preservación y el establecimiento de planes de manejo. De manera adicional, la población cautiva de *C. rhombifer* en la Ciénaga de Zapata representa una reserva importante contra la posible extinción de la especie endémica por lo que la carencia de información genética para guiar su manejo, va en detrimento de sus objetivos de conservación.

Teniendo en cuenta las interrogantes existentes en torno a las principales problemáticas que afectan a las especies de *Crocodylus* que habitan en Cuba, se ha propuesto el siguiente objetivo de trabajo: Caracterizar genéticamente las poblaciones más abundantes de las especies de *Crocodylus* que habitan en Cuba: *C. rhombifer*, *C. acutus* y sus supuestos híbridos con el empleo de marcadores nucleares y mitocondriales.

RESULTADOS

Grado de hibridación

La evaluación molecular reveló que 26 de 53 individuos (49,1%) provenientes del medio natural fueron identificados como híbridos *C. rhombifer* x *C. acutus* desde el punto de vista genético. Todos los híbridos genéticos presentaron el haplotipo mitocondrial previamente identificado como *C. rhombifer*- α (**Figura 1**). Con los híbridos identificados y removidos de las poblaciones en estudio, los valores corregidos de riqueza alélica dentro de cada población natural variaron desde 2,7 en *C. acutus* de la Ciénaga de Birama a 5,1 en *C. acutus* de la Ciénaga de Zapata.

Figura 1. Gráfico de barras mostrando los resultados inferidos ($K=3$), a partir del método de agrupamiento basado en inferencia Bayesiana. Cada barra en el eje X representa a un individuo, con el eje Y representando el grado de pertenencia de cada individuo a cada grupo genético. La identificación morfológica correspondiente (*C. Zapata Birama rhombifer*, *C. acutus* e híbridos) se muestra en la parte superior, con la indicación de la localidad de colecta en la base de la figura. La identidad haplotípica individual en términos de □□□□□ es indicada sobre los grupos. Los individuos que poseen los haplotipos raros son resaltados con los símbolos * (haplotipo D) y # halpotipo C).

Variación haplotípica

Los análisis de los fragmentos de secuencia para la región de control abarcaron ~458 pb, los cuales representan de manera aproximada el 54,33% (458/843 pb) del segmento en su totalidad. Un total de diez sitios polimórficos se encontraron para los individuos del medio natural ($n=90$) a partir del análisis de los 458 pb del fragmento de ADNmt, agrupándose en cuatro haplotipos (**Figura 2**). Las diversidades haplotípica y nucleotídica para las variantes cubanas exhibieron valores de 0,485 y 0,00905, respectivamente.

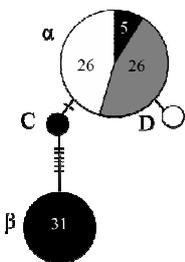


Figura 2. Red de haplotipos elaborada con 458 pb de la región de control del ADNmt para *Crocodylus* de Cuba, provenientes del medio natural. Los círculos coloreados indican la proporción de cada haplotipo, según la entidad muestreada y atendiendo a su identidad genética: *C. rhombifer* (blanco), *C. acutus* (negro) e híbridos (gris). El número de individuos con un haplotipo particular es indicado dentro de cada círculo, excepto para los haplotipos únicos. Los haplotipos inferidos, pero no muestreados son indicados por barras perpendiculares a las conexiones entre haplotipos.

El haplotipo más común resultó ser idéntico al haplotipo α previamente descrito para *C. rhombifer* ([Weaver et al. 2008](#)), el cual resultó ser además compartido entre *C. rhombifer* ($n=26$), *C. acutus* ($n=5$), e híbridos ($n=26$) provenientes todos de la Ciénaga de Zapata (**Figura 1** y **Figura 2**). El segundo haplotipo más común resultó ser idéntico al haplotipo β previamente publicado ([Weaver et al. 2008](#)), el cual se diferenció por nueve pasos mutacionales del haplotipo α , y fue solo detectado en Cuba para individuos identificados como *C. acutus* tanto morfológica como genéticamente (**Figura 1** y **Figura 2**).

Dos nuevos haplotipos fueron detectados en el presente estudio, uno para *C. rhombifer* (haplotipo D; **Figura 1** y **Figura 2**), y otro para *C. acutus* (haplotipo C; **Figura 1** y **Figura 2**) ambos ejemplares provenientes de la Ciénaga de Zapata. Tal como se detectó previamente ([Weaver et al. 2008](#)), *Crocodylus* de Cuba forman un grupo monofilético, relativo al resto de las

especies de *Crocodylus* del Nuevo Mundo, lo cual implica parafilia para *C. acutus* (**Figura 3**). Dentro del clado de *Crocodylus* de Cuba, hay una división con buen soporte estadístico (probabilidad posterior = 1.00) entre los haplotipos α y β , con el haplotipo D agrupándose de manera consistente (probabilidad posterior = 0,91) con el haplotipo α , y el haplotipo C mostrando afinidad con el haplotipo β , aunque esta última relación no obtuvo un apoyo significativo desde el punto de vista estadístico (**Figura 3**).

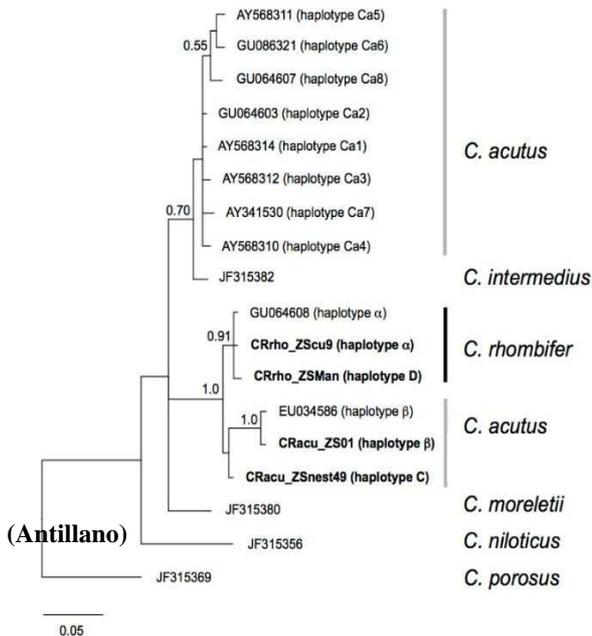


Figura 3. Árbol filogenético basado en inferencia Bayesiana, resultante de la información generada para *Crocodylus* del Nuevo Mundo y ejemplares de África (*C. niloticus*) y Australasia (*C. porosus*), a partir de 458 pb de la región de control del ADNmt. Las barras en gris indican los haplotipos adjudicados a *C. acutus*, mientras que la barra en negro indica a aquellos concedidos a *C. rhombifer*. Los individuos que representan a los haplotipos generados en este estudio han sido resaltados en negritas. El resto de los haplotipos empleados han sido indicados por su número de acceso en la base de datos Genbank. *C. porosus* fue empleado como grupo externo para enraizar el árbol. Los números sobre los nodos indican valores de probabilidad a posteriori.

La estimación de las distancias genéticas de Tamura-Nei ([Tamura y Nei 1993](#)) por pares de haplotipos representativos de las especies de *Crocodylus* del Continente Americano, reveló los menores valores de divergencia genética (0,002-

0,021) entre *C. rhombifer*-*C. acutus* de Cuba y *C. acutus* Continental-*C. intermedius* (0,009). Por su parte, la diferenciación entre los haplotipos de *C. acutus* proveniente del Continente con relación a *C. acutus* de Cuba resultó en el doble o más (0,035-0,051) de la referida entre los haplotipos de *C. rhombifer* y *C. acutus* encontrados hasta el presente en Cuba.

DISCUSIÓN

Variabilidad y estructura genética en poblaciones cubanas de *C. rhombifer* y *C. acutus*

Las poblaciones de *C. rhombifer* se encuentran entre las más amenazadas para los crocodylianos del Nuevo mundo, debido a su distribución geográfica restringida y escaso número. Sin embargo, no existen trabajos previos enfocados al estudio de la variabilidad y estructura genética en su medio natural. Unido a esto, la hibridación que tiene lugar entre las especies del género *Crocodylus*, ha sido considerada por algunos una de las amenazas más graves a las que se someten las especies que lo componen.

En el presente trabajo, los nueve *loci* estudiados resultaron polimórficos y mostraron para las poblaciones cubanas, índices de diversidad alélica ($A_R=2,7$ a $5,1$) similares a los observados para otras especies del género (*C. moreletii*) ($A_R=2,1$ a $5,6$), con el empleo de nueve *loci* microsatélites ([Dever et al. 2002](#)), ocho de los cuales son comunes a los empleados en nuestro estudio. Los valores de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) para las poblaciones cubanas, a partir del análisis de los *loci* microsatélites, se encontraron entre los más altos con respecto a los referidos para otras poblaciones de *Crocodylus*: *C. moreletii* ([Dever y Densmore 2001](#); [Dever et al. 2002](#)), *C. siamensis* ([Fitzsimmons et al. 2002](#)), *C. porosus* ([Russello et al. 2006](#)) al igual de lo que se pudiera plantear del polimorfismo genético encontrado con el empleo de los mismos *loci* microsatélites en otras especies. Dichos resultados son consistentes con la alta variabilidad mostrada por estos marcadores moleculares, lo que resalta su utilidad en la determinación de la estructura y variabilidad genética de poblaciones de *Crocodylus*. La mayor diferencia observada entre los valores de H_o y H_e determinados, se correspondió con la población de *C. rhombifer* de la Ciénaga de Zapata, lo cual pudiera considerarse en consonancia con el pequeño tamaño poblacional de esta última. Indicando así un ligero aumento de homocigotos en *C. rhombifer* de la Ciénaga de Zapata, probablemente causado por el apareamiento entre individuos consanguíneos dentro de la población. Por otra parte, este hecho pudiera estar además potenciado por la acción de la deriva genética, cuyo efecto se manifiesta precisamente en poblaciones de pequeño tamaño efectivo ([Rousset 2004](#)).

Entre las poblaciones cubanas de *Crocodylus acutus* y *C. rhombifer* en estudio, se obtuvieron como se esperaba altos valores de diferenciación genética sobre la base del estadístico F_{ST} ($F_{ST}=0,3009-0,4695$), estimado de la información generada a partir de los *loci* microsatélites. Teniendo en cuenta que se parte de la comparación de poblaciones que se corresponden a entidades morfológicas distintas, consideradas sobre esta base especies diferentes ([Cuvier 1807](#)), este resultado resulta totalmente lógico. Esta evidencia pudiera constituir una prueba de cercanía genética entre las entidades morfológicas en estudio y descritas por Cuvier en 1807.

Identificación y cuantificación del grado de hibridación entre *C. rhombifer* y *C. acutus*

La hibridación ha sido ampliamente reconocida por su papel importante en la diversificación de plantas ([Stebbins 1950](#)) y animales ([Dowling y Secor 1997](#)). No obstante, puede convertirse en una preocupación para la conservación de las especies cuando factores antropogénicos exacerban su frecuencia o lo causan de manera directa.

En el presente estudio detectamos un alto grado de hibridación, tanto en poblaciones naturales [49,1 % (26/53)] como en cautiverio [16,1% (22/137)] de *C. rhombifer*, en las cuáles la mayoría de los híbridos identificados como tal desde el punto de vista genético [57,7% (15/26)], fueron subestimados sobre la base de la morfología. Estos resultados se suman a la lista creciente de estudios en los que se ha documentado hibridación interespecífica entre miembros del género *Crocodylus*, con una elevada tasa de contradicciones en la clasificación específica, cuando se emplean solo caracteres morfológicos ([Dever y Densmore 2001](#); [Hekkala 2004](#); [Cedeño-Vazquez et al. 2008](#); [Rodriguez et al. 2008](#); [Weaver et al. 2008](#); [Rodriguez et al. 2011](#)).

CONCLUSION GENERAL

El análisis de la región de control del ADNmt reveló una acentuada variación intraespecífica para *C. acutus* y falta de diferenciación genética entre *C. rhombifer* y *C. acutus* de Cuba, lo que junto al alto grado de hibridación interespecífica, sugiere la necesidad de reevaluar el estatus especie específico considerado hasta el presente para las especies de *Crocodylus* de Cuba.