CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Caiman crocodilus fuscus* EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA MEDIANTE MARCADORES MITOCONDRIALES

CARLOS FELIPE HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
DIANA MARÍA DÍAZ MORENO

Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Biólogo

Director
CARLOS FERNANDO PRADA QUIROGA
Doctor en Genética

Codirector
SERGIO ALEJANDRO BALAGUERA REINA
Doctor en Biología

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ – TOLIMA
2020

PROGRAMA DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Caiman crocodilus fuscus* EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA MEDIANTE MARCADORES MITOCONDRIALES

AUTORES: **CARLOS FELIPE HERNÁNDEZ GONZÁLEZ (070100322013)**
DIANA MARÍA DÍAZ MORENO (070100372013)

DIRECTOR¨: **CARLOS FERNANDO PRADA QUIROGA**

CODIRECTOR: SERGIO ALEJANDRO BALAGUERA REINA

JURADOS **MARIO VARGAS-RAMIREZ**
DANIEL ALFONSO URREA MONTES

CALIFICACIÓN 5.0

__X__ APROBADO ____ REPROBADO

OBSERVACIONES: Se califica el trabajo de grado como Laureado (ver justificación anexa)

FIRMAS

JURADO 1.

JURADO 2.

Director del trabajo

Director del Programa (*Ad hoc*)

Ciudad y fecha: Ibagué, 30 de abril de 2020

DEDICATORIA

“Los cocodrilos y tú son el motor de mi vida, mamá,
donde quiera que me lleve la vida, llegaré por ti,
o quizá por perseguir alguna babilla”

- Felipe Hernandez

“A mi mama, mi abuela y mi tía,
las personas más importantes de mi vida“

- Diana Díaz

“In the loving memory of The Doc, Gigi and Iron”

- Diana & Felipe

“*If we save our wild places, we will ultimately save ourselves*”

- Steve Irwin

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a nuestros directores de tesis por su paciencia, determinación, enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal, su persistencia y por su capacidad para inspirar en nosotros un profundo amor por la ciencia, los recordaremos siempre con un gran aprecio y como nuestros modelos a seguir. Agradezco a mi mamá y papá, Mary y Carlos Hernando, mis abuelos, Dalis y Carlos, así como a mi tía Diana, por su amor, consejos, compañía y cuidado (Diana Díaz). Gracias a mi abuelita, a mi mamá y a mi papá por el regalo de la vida, por apoyarme, aconsejarme y sobre todo por creer en mí y ayudarme a crecer como ser humano (Felipe Hernandez). Gracias a la Universidad de Ibagué, a la Asociación Colombiana de Herpetología y al Grupo de Especialistas de Cocodrilos de la IUCN por la financiación de este proyecto. A Cristina Mora y Gualberto Pacheco, gracias a ustedes, su apoyo, enseñanzas, tiempo y esfuerzo, fue posible la realización de este trabajo, esperamos volver a verlos en el camino. A Sigifredo Clavijo por su tremenda ayuda en campo y sus consejos. A Rafael Antelo y la Fundación Palmarito, por su invaluable aporte de muestras de tejido. Gracias a los profesores Julio Cesar Carranza y Gustavo Vallejo, así como a los estudiantes Laura Osorio, Liliana López y Juan Medina del LIPT-UT por su apoyo, imprescindible para el desarrollo de este trabajo. Gracias especiales al Dr. Pablo Alberto Isaza Nieto, un ser humano increíble, un científico como ninguno y el más leal de los amigos, lo extrañaremos por siempre Doc. A los profesores Yair Molina, Daniel Urrea, Manuel Bernal y Maryeimy Varón por sus comentarios. A Moncada y Pollo por prevenirnos de más de un colapso nervioso. A los señores Odilia y Daniel por acogernos en miles de ocasiones. Gracias a Gina, Liliana, Pedro, Daniel, Fausto, Gazapo y todos nuestros parceros y parceras por acompañarnos en el camino de la vida. Gracias Diana, gracias Felipe. Finalmente, gracias esos héroes que inspiraron a toda una generación de científicos e infundieron en nosotros el amor por la fauna silvestre y las maravillas del mundo natural desde nuestra niñez, a ustedes les debemos lo que somos: Sir. David Attenborough, Jeff Corwin, Nick Baker, Richard Dawkins, los hermanos Kratt, Zoboomafoo y por supuesto, a Stephen Robert Irwin.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN **13**

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL **18**

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **18**

2. MARCO TEÓRICO **19**

2.1 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE **19**

2.2 ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA **26**

2.3 ANTECEDENTES **32**

3. METODOLOGÍA **35**

3.1 ÁREAS DE ESTUDIO **35**

3.2 TRABAJO DE CAMPO **40**

3.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN **43**

3.4 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS **45**

3.5 EDICIÓN DE SECUENCIAS **46**

3.6 SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS **46**

3.7 ANÁLISIS DE DATOS **48**

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **52**

4.1 GENERALIDADES **52**

4.2 DIVERSIDAD GENÉTICA, DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE *Caiman crocodilus fuscus* EN EL TOLIMA **54**

4.3 RELACIONES GENEALÓGICAS INTRA E INTER POBLACIONALES DE LA BABILLA EN EL TOLIMA **62**

4.4 RELACIONES FILOGENÉTICAS Y FILOGEOGRÁFICAS DE LAS POBLACIONES DE BABILLA DEL TOLIMA **67**

4.5 RECOMENDACIONES E IMPLICACIONES PARA EL MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE EN EL DEPARTAMENTO **73**

4.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO **74**

5. CONCLUSIONES **76**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **78**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía y sistemática de *Caiman crocodilus* Linnaeus, (1758). **20**

Tabla 2. Primers para la amplificación de los genes *COI* y *CytB* en *Caiman crocodilus.* **45**

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes *COI* y *CytB.* **45**

Tabla 4. Secuencias de referencia y origen obtenidas del GenBank. **46**

Tabla 5. Polimorfismos de las posiciones variables que componen los 12 haplotipos del Tolima para los genes *COI* y *CytB* concatenados de *C. crocodilus.* **55**

Tabla 6. Polimorfismos de las posiciones variables que componen los 5 haplotipos del Casanare para los genes *COI* y *CytB* concatenados de *C. crocodilus.* **55**

Tabla 7. Estadísticos de diversidad genética para las poblaciones de babilla del Tolima. **58**

Tabla 8. Grado de diferenciación poblacional y distancia geográfica entre las poblaciones de *Caiman crocodilus fuscus* muestreadas en el Tolima **60**

Tabla 9. Tests de neutralidad evolutiva para las poblaciones de babilla del Tolima. **61**

Tabla 10. Inferencias demográficas del Análisis de Clados Anidados. **71**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reflejo de los ojos de *Caiman crocodilus* al ser iluminados con linterna. **35**

Figura 2. Número de individuos de *Caiman crocodilus fuscus* avistados/reportados por localidad en el Tolima. **36**

Figura 3. Imagen mostrando como la alta concentración de macrófitas acuáticas imposibilita la navegación en bote en el municipio de Doima. **37**

Figura 4. Localidades de muestreo para colecta de babillas en el Tolima. **38**

Figura 5. Captura de individuos de *Caiman crocodilus* mediante pértiga y manual. **41**

Figura 6. Metodología de marcaje de crocodylianos mediante corte de escamas. **42**

Figura 7. Marcaje y toma de muestra en escamas caudales de *Caiman crocodilus.* **43**

Figura 8. Individuos de babilla colectados en cuatro poblaciones del Tolima. **52**

Figura 9. Ubicación de los 12 haplotipos de *Caiman crocodilus fuscus* en el Tolima y de los 4 haplotipos de *C. crocodilus crocodilus* en el Casanare. **56**

Figura 10. Curva de acumulación de haplotipos de marcadores *COI* y *CytB* que ilustra los haplotipos encontrados y esperados en el Tolima bajo tres estadísticos. **58**

Figura 11. Relaciones filogenéticas de las poblaciones muestreadas mediante inferencia bayesiana, máxima parsimonia y máxima verosimilitud para *COI* y *CytB.* **64**

Figura 12. Redes de haplotipos de *Caiman crocodilus* de 3 localidades del Tolima y una del Casanare con los genes *COI* y *CytB* concatenados. **65**

Figura 13. Filogenia reconstruida mediante IB y MP de las secuencias concatenadas de los genes COI y CytB disponibles para *Caiman crocodilus.* **68**

Figura 14. Redes de haplotipos y agrupamiento de haplotipos de los genes *COI* y *CytB* disponibles para *Caiman crocodilus* mediante TCS. **69**

RESUMEN

Históricamente el orden Crocodylia ha sido objeto de sobreexplotación; de las pieles de estas especies comercializadas a nivel mundial un alto porcentaje pertenecen a *Caiman crocodilus*, siendo Colombia su principal exportador. La legislación colombiana estableció una cuota de repoblación por la cual los zoocriaderos deben liberar un porcentaje de su producción como contribución a la conservación de la especie. Sin embargo, la falta de conocimiento de la composición genética de las poblaciones naturales ha impedido esta labor. Debido a la presencia de grandes poblaciones en el Tolima y que a la fecha no se cuenta con estudios genéticos para la especie en la región, se planteó una caracterización genética de sus poblaciones.

Se analizaron los genes mitocondriales *COI* y *CytB* para cuantificar su variabilidad genética, diferenciación poblacional, historia demográfica y estructura genética. Adicionalmente se utilizaron secuencias depositadas en bases de datos, así como nuevas secuencias para definir sus relaciones filogenéticas y filogeográficas. Como resultado, se identificaron 12 haplotipos para el Tolima, altos valores de diversidad genética, una fuerte diferenciación poblacional y nula evidencia de expansiones o disminuciones poblacionales. Los análisis filogenéticos y filogeográficos identifican a las poblaciones del Tolima dentro de un linaje distribuido desde el sur de Costa Rica hasta el Tolima y muestra una alta diferenciación con las poblaciones Cis-andinas. Estos resultados muestran que la diversidad genética debería ser tomada en cuenta a la hora de realizar cualquier tipo de translocación, ya que podría afectarse la integridad haplotípica y la estructura natural histórica de las poblaciones del departamento.

Palabras Clave: ADN mitocondrial, Crocodylia, Diversidad Genética, Filogeografía.

ABSTRACT

Historically, the order Crocodylia has been overexploited; a high percentage of the skins of these species traded worldwide belong to *Caiman crocodilus*, with Colombia being its main exporter. Colombian legislation established a repopulation quota whereby breeders must release a portion of their production as a contribution to the conservation of the species. However, the lack of knowledge of the genetic composition of the natural populations has hampered that task. Due to the occurrence of major populations in Tolima and that to date there are no genetic studies for the species in the region, a genetic characterization of these populations was proposed.

The mitochondrial genes COI and CytB were analyzed to quantify their genetic variability, population differentiation, demographic history and genetic structure. Additionally, sequences deposited in databases were used, as well as new sequences to define their phylogenetic and phylogeographic relationships. As a result, 12 haplotypes were identified for Tolima, with high genetic diversity values, strong population differentiation and no evidence of population expansions or decreases. Phylogenetic and phylogeographic analyses identified Tolima populations to be within a lineage distributed from southern Costa Rica to Tolima and shows a high differentiation with Cis-Andean populations. These results suggest that genetic diversity should be taken into account when making any type of translocation, since it might affect the haplotypic integrity and historical natural structure of the department's populations.

Keywords: Mitochondrial DNA, Crocodylia, Genetic Diversity, Phylogeography.

INTRODUCCIÓN

El orden Crocodylia comprende el grupo de reptiles vivos más grandes del mundo, en el que se incluye a los cocodrilos (familia Crocodylidae), los aligátores y caimanes (familia Alligatoridae), así como a los gaviales (familia Gavialidae) (Grigg & Kirshner, 2015). Este grupo de grandes reptiles se caracteriza por ser depredadores de hábitos semiacuáticos, que pasan la mayor parte del tiempo dentro del agua o cerca de ella y habitan en lagos, ríos y costas tropicales y subtropicales (De la Ossa et al., 2013; Grigg & Kirshner, 2015; M. Morales-Betancourt, Lasso, De La Ossa, & Fajardo-Patiño, 2013).

De las 27 especies de crocodylianos descritas a nivel mundial, diez se encuentran en Sudamérica y seis tienen distribución en Colombia, país que alberga la mayor riqueza de especies del orden junto a Brasil (Balaguera-Reina & González-Maya, 2009; Grigg & Kirshner, 2015; Iijima & Kubo, 2019). Esto ha despertado a través del tiempo un alto interés en la industria marroquinera nacional e internacional; sin embargo, para la segunda mitad del siglo XX, la explotación irracional de este recurso y el deterioro de su hábitat, generó una reducción y desaparición local de un gran porcentaje de poblaciones de las especies del orden (Ardila-Robayo, Moreno-Arias, Zúñiga, Martinez-Barreto, & Suarez-Daza, 2009; Balaguera-Reina & González-Maya, 2009; Macgregor, 2006; Ross, 1998). Como consecuencia de esto, al menos 11 de estas especies se encuentran bajo alguna categoría de amenaza, muchas de ellas en peligro crítico: *Crocodylus intermedius* (Balaguera-Reina, Espinosa-Blanco, Antelo, Morales-Betancourt, & Seijas, 2018), *Tomistoma schlegelli* (Bezuijen, Shwedick, Simpson, Staniewicz, & Stuebing, 2014), *Crocodylus siamensis* (Bezuijen, Simpson, Behler, Daltry, & Tempsiripong, 2012), *Crocodylus palustris* (Choudhury & de Silva, 2013), *Osteolaemus tetraspis* (Crocodile Specialist Group, 1996), *Alligator sinensis* (Jiang & Wu, 2018), *Gavialis gangeticus* (Lang, Chowfin, & Ross, 2019), *Crocodylus acutus* (Ponce-Campos, P., Thorbjarnarson & Velasco, 2012), *Mecistops cataphractus* (Shirley, 2014), *Crocodylus rhombifer* (Targarona, Soberón, Cotayo, Tabet, & Thorbjarnarson, 2008) y *Crocodylus mindorensis* (Van Weerd, Pomaro, De Leon, Antolin, & Mercado, 2016).

A raíz de esto, se ha establecido todo un sistema normativo para la regulación de su explotación y comercio a nivel mundial, así como diferentes iniciativas de conservación de algunas especies (Ardila-Robayo et al., 2009; Balaguera-Reina & Densmore, 2014; Balaguera-Reina, Prieto, Farfán-Ardila, Vides, & Carvajal-Bonilla, 2019; Macgregor, 2006). No obstante, la creación de estas estrategias requiere de un conocimiento profundo sobre la taxonomía, dinámicas poblacionales e historia evolutiva de las especies en cuestión y en Colombia la investigación entorno a ello se encuentra aún en una etapa incipiente (Frankham, 2010; M. Morales-Betancourt et al., 2013; Primack, 2014; Viloria-Lagares, 2017).

La especie *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) tiene la distribución más amplia de los Crocodylia del neotrópico y cuenta con la variación geográfica más alta del orden (Balaguera-Reina et al., 2010; De la Ossa et al., 2013; Grigg & Kirshner, 2015). Se han descrito cuatro subespecies: *C. c. fuscus* (Cope, 1868)*, C. c. crocodilus* (Linnaeus, 1758)*, C. c. apaporiensis* (Medem, 1955) y *C. c. chiapasius* (Bocourt, 1876); siendo esta última la única que no tiene distribución en Colombia (Jimenez-Alonso, 2016; Rueda-Almonacid et al., 2007; Venegas-Anaya et al., 2008). Aunque presentan diferencias morfológicas marcadas entre sí, la taxonomía tradicional ha demostrado no ser suficiente para identificar la variabilidad criptica dentro de ellas; o eso demuestran recientes análisis con genes mitocondriales, que han identificado diferentes linajes evolutivamente independientes dentro de *C. c. fuscus y de C. c. crocodilus* anteriormente desconocidos (Jimenez-Alonso, 2016; Vasconcelos et al., 2006; Venegas-Anaya et al., 2008). Teniendo en cuenta que la viabilidad de una especie y la persistencia a largo plazo de su potencial evolutivo dependen, entre otros factores, del mantenimiento de su variabilidad genética, la inclusión de estos linajes independientes y del concepto de unidades evolutivamente significativas en los programas de conservación es crucial para mantener la integridad genética de los linajes con una historia evolutiva única, tanto en poblaciones cautivas como naturales (Allendorf, Luikart, & Aitken, 2013; Cook-Patton, McArt, Parachnowitsch, Thaler, & Agrawal, 2011; Laikre et al., 2016; Viloria-Lagares, 2017).

La babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) es uno de los crocodylianos más explotados del planeta; a esta especie corresponde cerca del 70% de las pieles del mercado internacional y estas provienen en su gran mayoría de Colombia (Larriera, Webb, Velasco, Rodriguez, & Ortiz, 2004; Macgregor, 2006). A pesar de que la IUCN cataloga a la especie como Preocupación Menor en términos de su estado de conservación, en países como Colombia, se tienen datos insuficientes para definir su estado a nivel local (Balaguera-Reina & Velasco, 2019). Se han realizado algunos monitoreos poblacionales en los departamentos de Córdoba (Ulloa-Delgado & Cavanzo-Ulloa, 2003; Viloria-Lagares, Bloor, & Moreno-Arias, 2017), Magdalena (Balaguera-Reina & González-Maya, 2009) y Cundinamarca (Moreno-Arias, Ardila-Robayo, Martínez-Barreto, & Suarez-Daza, 2013), pero se desconoce la estructura poblacional de la especie en el resto del país. La investigación sobre la variabilidad genética, que busca determinar los linajes que componen la historia evolutiva de la especie en el país, inició recientemente, pero ya ha logrado establecer dos grandes linajes de la subespecie *C. c. fuscus* y descartado la existencia de *C. c. chiapasius* en Colombia (Jimenez-Alonso, 2016).

Este conocimiento es vital, si se considera que la zoocría ha logrado establecerse de tal forma que se producen alrededor de 700.000 pieles anuales en Colombia y que las grandes poblaciones de esta especie, se concentran en las granjas de producción comercial (Ardila-Robayo et al., 2009; Barahona, Bonilla, Martinez, & Naranjo, 2000). Las cuotas de explotación se definieron como estrategia para la recuperación de las poblaciones silvestres y aminorar el impacto que tuvo el uso irracional del recurso; así lo establece el Decreto 1608 de 1978. Sin embargo, punto clave del decreto consiste en la liberación al medio natural de cierto porcentaje de la producción de los zoocriaderos del país como cuota de repoblación (Balaguera-Reina & Densmore, 2014). Desafortunadamente, el escaso conocimiento sobre diferentes aspectos de la biología, ecología y genética poblacional de la especie, no ha permitido la implementación de la estrategia de liberación pactada en el decreto (Ardila-Robayo et al., 2009). Esto representa un inconveniente no solo de tipo ambiental, sino económico, si se tiene en cuenta que por ley los zoocriaderos del país no pueden aprovechar como recurso a los animales que constituyen la cuota de repoblación, para ello se debe pagar por el

aprovechamiento de cada animal que hace parte de dicha cuota (Ardila-Robayo et al., 2009; Rodríguez Mancera & García Reyes, 2008).

Históricamente en el Tolima ha existido un vacío de información sobre el estado del orden Crocodylia en general y la escasa información que existe no es de fácil acceso o es muy poco representativa (Barahona et al., 2000; M. Morales-Betancourt et al., 2013). A partir de los análisis poblacionales disponibles, se evidencia la urgencia de implementar diferentes estrategias de conservación y repoblación en el alto magdalena, ya que existen zonas donde la especie se encuentra prácticamente desaparecida (Ardila-Robayo et al., 2009). Se justifica entonces la necesidad de generar el conocimiento base para la correcta translocación de los animales que constituyen la cuota de repoblación, lo cual requiere de un profundo análisis de la variabilidad genética, diferenciación poblacional, relaciones filogenéticas y estructura filogeográfica de las poblaciones de babilla del departamento, teniendo en cuenta que en el Tolima existe el único zoocriadero activo del Alto Magdalena. La alta variabilidad nucleotídica de los genes mitocondriales y la disponibilidad de secuencias de referencia para la especie (y sus diferentes subespecies), los convierten en una herramienta adecuada para generar dicho conocimiento (Densmore & Owen, 1989; Jimenez-Alonso, 2016; Venegas-Anaya et al., 2008).

Por tanto, con el fin de generar la información base necesaria para proponer recomendaciones de manejo y conservación de la especie, en aras de propender por la integridad haplotípica de la subespecie, se realizó una caracterización de la diversidad genética, diferenciación poblacional, relaciones filogenéticas y estructura filogeográfica de las poblaciones de babilla del Tolima, mediante el análisis de la variabilidad de los genes mitocondriales *COI* y *CytB*. El conocimiento generado no solo servirá de base para futuros estudios sobre la especie, sino que permitirá diseñar de manera adecuada las estrategias de repoblación de babilla en el departamento.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéticamente algunas poblaciones de Babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) en el departamento del Tolima mediante dos genes mitocondriales.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la diversidad genética, diferenciación poblacional e historia demográfica de algunas poblaciones de *Caiman crocodilus fuscus* en el Tolima mediante los marcadores mitocondriales *COI* y *CytB.*

Identificar las relaciones genealógicas intra e interpoblacionales de *Caiman crocodilus fuscus* en el Tolima mediante redes de haplotipos y filogenias moleculares.

Establecer las relaciones filogenéticas y filogeográficas de las poblaciones colectadas con secuencias disponibles en el NCBI para identificar el linaje al que pertenecen.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

2.1.1 Taxonomía: *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758), conocida como babilla, baba o caimán de anteojos es una especie perteneciente a la familia Alligatoridae del orden Crocodylia que habita naturalmente en Centro y Sur América e introducida en Norte América y las Antillas (Balaguera-Reina & Velasco, 2019; M. Morales-Betancourt et al., 2013). La especie presenta sinonimias como *Lacerta crocodilus* (Linnaeus, 1758), *Caiman sclerops* (Schneider, 1801), y *Alligator sclerops* (Duméril & Bibron, 1836), independientemente del autor y el paratipo pero actualmente se reconoce como *Caiman crocodilus* (Balaguera-Reina & Velasco, 2019). Debido a la gran variación geográfica de *Caiman crocodilus* se han reconocido tradicionalmente cuatro subespecies que conforman el complejo *Caiman crocodilus*, siendo éstas: *C. crocodilus crocodilus* (Linnaeus, 1758)*, C. crocodilus chiapasius* (Bocourt, 1876)*, C. crocodilus fuscus* (Cope, 1868) y *C. crocodilus apaporiensis* (Medem, 1955). Tradicionalmente en Colombia se han reconocido a las poblaciones de *Caiman crocodilus* del este y del oeste de la cordillera occidental de los Andes como dos subespecies distintas; en base a características morfológicas se ha propuesto que las poblaciones de la costa Pacífica pertenecen a *C. c. chiapasius*, mientras que las de los Andes y Costa Caribe fueron asignadas como *C. c. fuscus* (Medem, 1981; Rueda-Almonacid et al., 2007). Sin embargo, Jimenez-Alonso, (2016), en estudios basados en secuencias de ADN mitocondrial, muestra que *C. c. chiapasius* está restringido a México, por lo que las poblaciones de la costa Pacífica de Ecuador y de Colombia, podrían estar catalogadas como *C. c. fuscus*. En cuanto a la subespecie *C. c. fuscus*, fue descrita inicialmente como *Perosuchus fuscus*, y luego redescrita como subespecie de *Caiman crocodilus*: *C. c. fuscus.* Existe aún cierta incertidumbre respecto a su independencia taxonómica con *C. c. chiapasus,* ya que Venegas-Anaya et al., (2008), mediante herramientas moleculares encontraron un linaje que une ciertos individuos en Centro América identificados morfológicamente como *C. c. chiapasus* con otros identificados como *C. c. fuscus*.

Tabla 1. Taxonomía y sistemática de *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Reptilia
Subclase	Diapsida
Clado sin definir	Archosauria
Superorden	Crocodylomorpha
Clado sin definir	Eusuchia
Orden	Crocodylia
Familia	Alligatoridae
Género	Caiman
Especie	*Caiman crocodilus*
Subespecies	*C. c. apaporiensis* *C. c. chiapasus* *C. c. crocodilus* *C. c. fuscus*

2.1.2 Descripción: *Caiman crocodilus* es una de las especies más pequeñas y abundantes del orden Crocodylia en Suramérica: los machos adultos llegan a medir 2 m y pesar unos 65 kg; en tanto que las hembras alcanzan una talla de 1,1-1.8 m. Esta especie se caracteriza por presentar una arista o “entrecejo” en forma de media luna ubicada justo anterior a los ojos y sobre el dorso del hocico, de donde deriva el nombre popular de caimán de anteojos. Presentan dimorfismo sexual secundario muy acentuado en el tamaño de los machos, los cuales exceden ampliamente la talla corporal de las hembras adultas (Rueda-Almonacid et al., 2007). Las poblaciones de la costa Pacífica y costa Caribe colombiana presentan diferencias en su coloración. Las poblaciones tradicionalmente catalogadas como *C. c. crocodilus* tienen el dorso verde oliva y presentan manchas y puntos cafés oscuros o negros sobre la cabeza, cuerpo y cola. Por otro lado, los adultos de las poblaciones tradicionalmente catalogadas como *C. c. fuscus* tienen el dorso café claro, café oliva o verde amarillento, sin manchas oscuras; las

extremidades con la misma coloración del dorso, y barras oscuras en la cola (Rueda-Almonacid et al., 2007).

Viven en una gran cantidad de ambientes acuáticos abiertos, de aguas tranquilas o corrientes lentas, en el piso térmico cálido a alturas inferiores a los 1.000 m. Suele observarse en pantanos, lagunas, esteros y morichales, madreviejas, caños, ríos, arroyos y quebradas y ocasionalmente ingresan en los manglares, marismas y ciénagas salobres. En casos excepcionales colonizan quebradas con lechos rocosos y cauces torrentosos (De la Ossa et al., 2013).

2.1.3 Origen y Distribución: El orden Crocodylia apareció durante el cretácico superior (hace 100,5 - 66 millones de años) y en la actualidad está representado por tres familias: Gavialidae, Crocodylidae y Alligatoridae, las cuales presentan historias evolutivas separadas desde hace aproximadamente 100 millones de años (Castellanos-Labarcena & Milián-García, 2017). Estas tres familias provienen de una población de *Hylaeochampsidae* sp. y han estado evolucionando independientemente desde el Cretácico tardío (hace 100,5 - 66 millones de años) (Grigg & Kirshner, 2015; Mook, 1934). El registro más antiguo de un aligatórido descrito en América del Sur es de *Eocaiman cavernensis* del Eoceno temprano (hace 56 - 34 millones de años) en la provincia de Chubut, Argentina; la presencia de este reptil también se ha reportado para Brasil (Chiappe, 1988). En Colombia se cuenta con el registro de cinco especies de esta familia (*Eocaiman sp., Caiman lutescens, Purussaurus neivensis, Balanerodus logimus y Mourasuchus atopus*), de las cuales algunas solo han sido descritas para Colombia (Moreno-Bernal, Head, & Jaramillo, 2016).

El número de especies encontradas que datan del Cenozoico (66 millones de años hasta la actualidad), permiten inferir que los caimanes fueron los crocodyliformes más abundantes y ampliamente distribuidos en las zonas donde hoy se encuentran las especies que los precedieron (M. Morales-Betancourt et al., 2013).

2.1.4 Estado de Conservación y Amenazas: A pesar de que *Caiman crocodilus* se encuentra catalogada como Preocupación Menor según la IUCN (Balaguera-Reina & Velasco, 2019), de las 27 especies que constituyen el orden Crocodylia, la mitad está en alguna categoría de amenaza y de ellas gran parte están en peligro crítico (Balaguera-Reina et al., 2018; Bezuijen et al., 2014, 2012; Choudhury & de Silva, 2013; Crocodile Specialist Group, 1996; Jiang & Wu, 2018; Lang et al., 2019; Ponce-Campos, P., Thorbjarnarson & Velasco, 2012; Shirley, 2014; Targarona et al., 2008; Van Weerd et al., 2016). Esto a raíz de dos tipos de amenazas: Las primeras, denominadas amenazas directas, tienen que ver con las acciones dirigidas al uso directo de los individuos, y las segundas, llamadas amenazas indirectas, que están relacionadas con el deterioro ambiental y sus consecuencias inmediatas, a mediano y largo plazo.

En cuanto a las amenazas directas, la principal es su uso no sostenible para la obtención de pieles (M. Morales-Betancourt et al., 2013). Actualmente la babilla (*Caiman crocodilus*), es la especie que más aporta al comercio de pieles, específicamente la subespecie *Caiman crocodilus fuscus,* la cual, de acuerdo con la normativa, sólo se aprovechan los individuos provenientes de zoocriaderos, sin embargo, es conocida la existencia de la explotación y comercio ilegal (M. A. Morales-Betancourt, Fajardo-Patiño, Lasso, & De la Ossa, 2013). Además de la extracción de la piel, los crocodylianos son usados con distintos fines: consumo, ornamental, medicinal y como mascotas.

En el caso de la babilla (*C. c. fuscus*), su cacería está dirigida principalmente para el consumo de subsistencia. Sin embargo, este consumo ha aumentado en los últimos años, debido a la mayor demanda de carne por la migración de personas a las zonas rurales y alejadas, bien conservadas. Ese hecho incrementa el uso de fauna silvestre como fuente de alimentación, como en el caso del consumo de la carne de los crocodylianos, frente a la no obtención de otras fuentes proteicas. (M. Morales-Betancourt et al., 2013).

Frente a las amenazas indirectas, este grupo ha sido y es, gravemente afectado por la destrucción del hábitat, la cual es una de las causas principales de la disminución

poblacional. Los humedales se encuentran entre los ecosistemas más amenazados a nivel mundial y se estima que se ha perdido cerca del 50% en el planeta en el último siglo a causa de la irrigación para agricultura, desarrollo urbano y sistemas de regulación de agua (Shine & de Klemm, 1999). Dado que los crocodylianos cumplen su ciclo de vida en diferentes tipos de hábitats, se ven afectados entonces por actividades humanas que alteran tanto los ecosistemas terrestres como los acuáticos. Así, a pesar de que algún hábitat que utilice una especie se encuentre en buen estado de conservación, si alguna de las áreas de las cuales depende su ciclo vital es destruida o alterada, las comunidades pueden verse afectadas. Por último, la pesca continental está incidiendo sobre los crocodylianos tanto de forma indirecta (al quedar atrapados en los artes de pesca), como directa (al ser usados como carnada) (M. Morales-Betancourt et al., 2013).

2.1.5 Importancia Ecológica: Estos animales cumplen con una serie de funciones ecosistémicas, relacionadas con su rol de depredadores; por lo que son importantes para el mantenimiento y regulación de las comunidades acuáticas; sin mencionar que son consideradas como control biológico natural de diferentes especies plaga o vectores de enfermedades y cumplen un papel en el ciclaje de nutrientes. También son transformadores de la materia orgánica en detritos a partir de sus excrementos y sus propios cadáveres, lo cual contribuye a elevar el nivel de productividad del ecosistema al cual pertenecen (Ardila-Robayo et al., 2009; M. Morales-Betancourt et al., 2013). Es así que, la extinción local de estas especies, se ha visto relacionada con desequilibrios ecosistémicos, para citar dos ejemplos de esto: en una localidad de Brasil se reportó el aumento de las poblaciones de pirañas (*Serrasalmus sp*.) tras a la desaparición del caimán negro; en Argentina por su parte, se presentó un incremento de caracoles del género Pomacea, vectores de algunos parásitos como *Angiostrongylus sp* relacionado con la cacería excesiva del caimán o yacaré (Medem, 1981; Ross, 1969).

2.1.6 Importancia Económica: Además de su función ecológica, los crocodylianos también tienen una importancia económica, debido a la alta demanda por su piel en la industria marroquinera, en especial de *Caiman crocodilus fuscus*, la cual es la especie de fauna silvestre más explotada en nuestro país, generando ganancias de entre 20 y 25

millones de dólares al año (Rodríguez Mancera & García Reyes, 2008). Colombia es el principal exportador de pieles de crocodylianos del mundo, aportando el 63% del total de las pieles del mercado y de este porcentaje, *C. crocodilus fuscus* representa el 97,7% (M. A. Morales-Betancourt et al., 2013).

Inicialmente, la comercialización de la piel incluía las especies de los géneros *Crocodylus* y de *Melanosuchus*, dada la menor osificación de los osteodermos, por lo que eran consideradas pieles clásicas (mejor calidad). La piel de *Caiman crocodilus fuscus* se considera de inferior calidad, dada la osificación mayor de los osteodermos; la caza comercial y consecuente aprovechamiento, se inició en la década de los 50, cuando las poblaciones de crocodylidos considerados clásicos habían sido diezmadas y no era rentable la operación extractiva (M. Morales-Betancourt et al., 2013). De manera específica, la cacería de babillas comenzó con las capturas de *C. c. fuscus* en la costa Caribe y cuenca del Magdalena, posteriormente se trasladó a la Orinoquia y Amazonia, aprovechando *Caiman crocodilus crocodilus* y, por último, pasó a las cuencas del río Atrato y Acandí (cuenca Caribe) con *C. c. fuscus* (M. Morales-Betancourt et al., 2013).

En la actualidad las babillas obtenidas de zoocriaderos proporcionan la mayor cantidad de pieles de crocodylianos para los mercados internacionales (Macgregor, 2006). Las seis especies que se encuentran en Colombia, son utilizadas además para el consumo de carne, algunas con mayor predilección que otras (Rueda-Almonacid et al., 2007). Las restricciones en el consumo vienen dadas principalmente por el tamaño de los animales, con mayor preferencia por los individuos más pequeños debido a que su carne es más tierna y de mejor sabor. Por ello, las principales especies objeto de consumo son las de tallas menores como la babilla (*Caiman crocodilus*) y los cachirres (*Paleosuchus palpebrosus* y *Paleosuchus trigonatus*) (M. Morales-Betancourt et al., 2013).

De manera indirecta estos animales también pueden ser elementos de carácter turístico dada su vistosidad como especies raras y emblemáticas. Así, al mantener las poblaciones en buenas condiciones se pueden ofrecer recorridos nocturnos y/o diurnos

a los turistas para el avistamiento de estos animales. (M. Morales-Betancourt et al., 2013).

2.1.7 Legislación sobre la Zoocría en Colombia: En Colombia durante 1957 y 1968 se desarrollaron las primeras dos resoluciones enfocadas en la regulación de la caza y exportación de individuos vivos de la especie *Caiman crocodilus fuscus* en el rio Magdalena y sus tributarios a lo largo de la costa caribe (Balaguera-Reina & Densmore, 2014). No fue hasta 1975, que entró en rigor el convenio CITES para la prohibición y/o regulación, según el caso, de la caza y comercio de estos y muchos otros animales silvestres (Ross, 1998; Webb, Manolis, & Jenkins, 2012). Posteriormente, durante 1999 y 2011 fueron publicadas 14 resoluciones relacionadas con el desarrollo de medidas de gestión para regular el comercio en dos subespecies de *Caiman crocodilus* (*crocodilus* y *fuscus*), con el objetivo de reducir la caza furtiva y el tráfico ilegal de estos organismos (Balaguera-Reina & Densmore, 2014).

La zoocría logró establecerse de tal forma que se producen alrededor de 700.000 pieles anuales en Colombia, sin embargo, las grandes poblaciones de esta especie, se concentran en las granjas de producción comercial (Ardila-Robayo et al., 2009; Barahona et al., 2000). Dichas cuotas de explotación se definieron como estrategia para prevenir el uso irracional del recurso y aminorar el impacto sobre las poblaciones naturales; así lo establece el Decreto 1608 de 1978, sin embargo, punto clave del decreto consistía en la liberación al medio natural de cierto porcentaje de la producción de los zoocriaderos del país como cuota de repoblación, lo cual no ha podido realizarse por falta de información (Ardila-Robayo et al., 2009; Balaguera-Reina & Densmore, 2014)

2.2 ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

2.2.1 Genética de la Conservación: La genética de poblaciones es una parte central de la teoría evolutiva moderna, y su aporte a la biología de la conservación ha ido creciendo conforme su teoría y práctica han ido integrándose en la disciplina que ahora se conoce como Genética de la Conservación. Uno de los objetivos clave de la genética de la

conservación es ayudar a minimizar las extinciones evitando los problemas relacionados con tamaños efectivos pequeños, como el efecto deletéreo de la endogamia, la pérdida de diversidad y la habilidad para evolucionar en respuesta a los cambios ambientales, así como los efectos deletéreos que ocurren por la cruza entre individuos muy distintos (Rocha & Gasca, 2007).

Los análisis genéticos también permiten estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas y el efecto de la acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas. Por otro lado, con la genética también se puede dar solución a problemas de tipo taxonómico, por ejemplo, establecer especies prioritarias para la conservación, resolver incertidumbres taxonómicas, definir unidades evolutivamente significativas y unidades de manejo, y en el ideal, poder proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Rocha & Gasca, 2007).

2.2.2 Filogeografía: La filogeografía parte de la idea de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía. Esta estructura puede ser muy compleja, como en especies que habitan áreas de fuerte actividad tecto–volcánica o paleoclimática, o de menor complejidad, como el caso de poblaciones con tasas altas de migración o cuyo aislamiento, hablando en tiempos geológicos, es relativamente reciente (e.g. última glaciación) (Aguilera-Miller, 2011; Viloria-Lagares et al., 2017). De esta forma, es posible detectar la estructura filogeográfica entre poblaciones cuando la dimensión genealógica es analizada a la par de los eventos geológicos y geográficos.

Es decir, la estructura filogeográfica refleja la interacción entre los procesos demográficos y genealógicos y la dinámica de los procesos de la tierra (geológicos o climáticos). Así, la filogeografía se define como la disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Este análisis conjunto de aspectos filogenéticos, de genética de poblaciones y de biogeografía en poblaciones naturales, ha tenido repercusiones importantes en las áreas de biología

evolutiva, ecología y conservación (Aguilera-Miller, 2011; Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009; Viloria-Lagares et al., 2017).

2.2.3 Marcadores Mitocondriales: El ADN mitocondrial de los vertebrados es una molécula de doble cadena de círculo cerrado que varía en tamaño de unos 15.500 a más de 27.000 pares de bases, el cual constituye una unidad genealógica ligada de herencia matrilineal que presenta diferentes tasas evolutivas en sus secuencias. Por esta razón se ha convertido rápidamente en una de las moléculas más estudiadas en el campo de la biología evolutiva, ya que esta aparentemente evoluciona de 5 a 10 veces más rápido que el ADN nuclear. Esta característica hace que el ADN mitocondrial sea valioso a la hora de determinar las relaciones filogenéticas entre taxones estrechamente relacionados (Densmore & Owen, 1989).

Este es el caso de los genes Citocromo Oxidasa 1 (*COI*) y Citocromo B (*CytB*), los cuales brindan información de la estructura poblacional de las especies y su interpretación filogenética (Viloria-Lagares, 2017). Además, mediante el análisis nucleotídico de estos marcadores, es posible identificar la diversidad genética de las poblaciones por debajo del nivel de especie y aspectos sobre el comportamiento de las poblaciones de una especie como su estructura, diferenciación, demografía, filogenia entre otros (Bloor, Ibáñez, & Viloria-Lagares, 2015; Farias et al., 2004; Vasconcelos et al., 2006; Venegas-Anaya et al., 2008). Estos análisis también son útiles en la conservación de especies, donde pueden contribuir potencialmente a la identificación de unidades filogenéticas, de población u otras unidades evolutivas significativas (Posso-Peláez, 2013; Viloria-Lagares, 2017).

2.2.4 Diversidad Genética: La diversidad genética es la materia prima para la evolución, de ella dependen tanto la adaptación como la especiación. Los niveles altos de diversidad pueden dar la habilidad para responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales, y fue por ello que los primeros trabajos de conservación buscaban simplemente mantener niveles de diversidad altos. En general se han encontrado patrones en los niveles de diversidad con los que se hacen inferencias

en los estudios de conservación; por ejemplo, las poblaciones grandes, que se entrecruzan, tienen altos niveles de diversidad genética, mientras que las poblaciones pequeñas y asexuales tienen niveles de diversidad bajos (Rocha & Gasca, 2007).

2.2.5 Diferenciación Poblacional: La diferenciación entre grupos es uno de los temas fundamentales del campo de la genética poblacional. Las comparaciones del nivel de variación entre subpoblaciones con el nivel de variación en la población total se han empleado con frecuencia en la teoría genético-poblacional, en los métodos estadísticos para el análisis de datos y en los estudios empíricos de las distribuciones de la variación genética. Los índices de fijación de Wright y *Fst* en particular, han sido fundamentales para este esfuerzo. El *Fst* de Wright se definió originalmente como la correlación entre dos gametos de la misma subpoblación muestreados al azar cuando la correlación de dos gametos muestreados al azar de la población total se establece en cero. Actualmente se dispone de varias definiciones de cantidades similares a las de *Fst*, basadas en una variedad de formulaciones conceptuales diferentes, pero todas ellas miden algún aspecto de la diferenciación de la población (Jakobsson, Edge, & Rosenberg, 2013)

2.2.6 Neutralidad Evolutiva e Historia Demográfica: A partir de estos análisis se puede distinguir entre secuencias evolucionando en equilibrio mutación-deriva y secuencias evolucionando bajo un proceso no aleatorio, como selección, expansiones y contracciones demográficas, introgresión, entre otros, lo cual los hace útil para dilucidar la historia demográfica de una población (Depaulis & Veuille, 1998; Hartl & Clark, 1997; Simonsen, Churchill, & Aquadro, 1995). La prueba de significancia estadística que se realiza, evalúa si las diferencias encontradas entre los parámetros esperados en neutralidad son significativas o no y en base a esto se acepta o rechaza la hipótesis nula de equilibrio (Caiafa-Hernández, 2013; Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

2.2.7 Modelos Evolutivos: Para calcular las distancias entre pares de secuencias, así como para realizar búsquedas con los métodos basados en distancias, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana es necesario especificar un modelo de evolución para los datos (Horiike, 2016). Los modelos de evolución son conjuntos de suposiciones

sobre el proceso de sustitución de nucleótidos (Kimura, 1983). Ellos describen las probabilidades diferentes de cambio de un nucleótido a otro a lo largo de un árbol filogenético, permitiendo escoger entre diferentes hipótesis filogenéticas para explicar los datos a la mano (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012). Existen programas que implementan todos los 203 tipos de matrices de sustitución reversibles, y cuando se combinan con frecuencias base desiguales/iguales, la variación de la tasa de distribución gamma entre sitios y una proporción de sitios invariables para un total de 1624 modelos, los cuales se evalúan en determinado alineamiento y se escoge el modelo que más se ajuste mediante criterios de selección (David Posada & Buckley, 2004)

2.2.8 Filogenias Moleculares: La similitud de las funciones biológicas y los mecanismos moleculares en los organismos vivos sugiere fuertemente que las especies descienden de un antepasado común. La filogenética molecular utiliza la estructura y función de las moléculas y cómo cambian con el tiempo para inferir estas relaciones evolutivas. El objetivo principal de los estudios filogenéticos moleculares es recuperar el orden de los eventos evolutivos y representarlos gráficamente en árboles evolutivos en los cuales se vislumbren las relaciones entre especies o genes a lo largo del tiempo. Este es un proceso extremadamente complejo, complicado aún más por el hecho de que no hay una sola manera correcta de abordar todos los problemas filogenéticos. Los conjuntos de datos filogenéticos pueden consistir en cientos de especies diferentes, cada una de las cuales puede tener diferentes tasas de mutación y patrones que influyen en el cambio evolutivo. Por consiguiente, existen numerosos modelos evolutivos y métodos estocásticos diferentes disponibles que dependen de la naturaleza del estudio y de los datos utilizados (Lowenstein, 1986).

2.2.9 Redes de Haplotipos: La filogeografía utiliza con mayor frecuencia métodos de reconstrucción filogenética, y métodos filogenéticos tradicionales. A diferencia de los árboles bifurcados tradicionales, las redes de haplotipos permiten describir las relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcados, en los cuales un único haplotipo puede dar origen a muchos haplotipos arreglados a manera de redes. Dichas redes son conocidas como redes mínimas de haplotipos, en otras palabras, las conexiones entre haplotipos

son dadas por el mínimo número posible de mutaciones entre ellos. Debido a que se trabaja con filogenias de haplotipos a nivel intraespecífico, pueden presentar muy poca variación e implican un tiempo evolutivo mucho menor (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009).

Las conexiones entre los haplotipos representan eventos coalescentes, y pueden hacerse a partir de la red de parsimonia predicciones como: Los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser alelos ancestrales. Los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales. Dentro de la red, los haplotipos ancestrales son de interior y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos o de extremos (Clement, Posada, & Crandall, 2000).

Se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica (básicamente porque los individuos que tienen esos haplotipos han tenido mayor tiempo para dispersarse); y los haplotipos con una única conexión se prevé estén unidos a haplotipos de la misma población (dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse) (Ramos Herrera, 2015)

2.2.10 Análisis Filogeográfico de Clados Anidados: Este análisis permite obtener información de procesos históricos, como estimaciones más cercanas y más realistas de flujo génico, deriva génica o expansión, además de ayudar a estimar parámetros más complejos y modelos reales de estructura poblacional en un contexto geográfico (Aguirre-Planter, 2007). Se basa en dos parámetros básicos: el primero, llamado *Dc*, mide la distancia promedio que hay entre un individuo que tiene el haplotipo de un clado particular y el centro geográfico de todos los individuos del mismo clado, sin importar de qué haplotipo son; el segundo es *Dn*, es la distancia promedio entre un individuo que tiene el haplotipo del clado particular y el centro geográfico de todos los individuos del clado del siguiente nivel jerárquico, el cual contiene el clado de interés, y sin importar qué haplotipos tiene (Viloria-Lagares, 2017).

Así, comparando los centros geográficos, y si los clados son derivados (puntas) o ancestrales (interiores), se pueden hacer diferentes tipos de inferencia (*i.e.* si el clado surgió producto de un evento de aislamiento por distancia, simpatría, alopatría, fragmentación o restricción del flujo génico) (Viloria-Lagares, 2017). Es una herramienta útil para la definición de Unidades Evolutivamente Significativas o ESU, una población o grupo de poblaciones que está sustancialmente aislada reproductivamente de otras unidades iguales, y representa un componente importante en el acervo evolutivo de la especie (Ryder, 1986). Waples, (1995) lo define como grupos monofiléticos de poblaciones genéticamente diferenciadas dentro de una gran especie monofilética que muestra una larga historia de evolución independiente.

Los ESUs deben ser reconocidos como unidades de planificación de conservación para evitar la hibridación y el potencial de depresión por exogamia (DeSalle & Amato, 2004; Templeton et al., 1986). Estos agrupamientos también pueden ser considerados como especies filogenéticas que no se pueden recuperar si se pierden (Cracraft, 1983; Moritz, 2002). En efecto, el manejo de varios taxones genéticamente distintos como una sola unidad puede resultar en la extinción local de los linajes únicos (Daugherty, Cree, Hay, & Thompson, 1990).

2.3 ANTECEDENTES

Vasconcelos et al., (2006) cuantificaron la variabilidad genética y distribución espacial en *C. crocodilus crocodilus*, en nueve localidades de Perú, Brasil y Guayana Francesa, con un total de 125 individuos, empleando el marcador mitocondrial Citocromo B. En este estudio se encontró que la divergencia entre las poblaciones de la cuenca del Amazonas y las localidades fuera de ella es significativa; sin embargo, la inferencia del Análisis de Clados Anidados no puede distinguir entre la expansión continua del área de distribución, la colonización a larga distancia o la fragmentación pasada como causa de la estructura genético-poblacional encontrada. En este estudio, se considera que la fragmentación pasada es poco probable debido al bajo número de pasos mutacionales que separan a esas regiones. Según los autores, la divergencia encontrada en las poblaciones de esta

subespecie es probablemente mantenida por la capacidad reducida de la especie para cruzar barreras de agua salada. Dentro de la cuenca amazónica, la expansión continua del área de distribución, pero sin aislamiento por distancia es el proceso que más probablemente causa la estructuración genética. Los patrones genéticos observados fueron compatibles con la ecología de *C. crocodilus* y la historia de la explotación humana. A medida que la caza comercial agotaba las especies más valiosas como *M. niger*, *C. crocodilus* amplió su área de distribución y su nicho ecológico. Tras un período de intensa caza, *C. crocodilus* estaría experimentando ahora una recuperación y una segunda expansión de la población en la Amazonía.

Venegas-Anaya et al., (2008) realizaron un estudio filogenético en tres subespecies de *C. crocodilus*, con el fin de caracterizar la variación genética dentro de la especie, probar la validez de las subespecies actualmente reconocidas mediante morfometría y sus distribuciones e inferir la historia evolutiva de esta especie. Basado en marcadores mitocondriales (Citocromo b y Citocromo Oxidasa I), en 45 individuos en diferentes zonas geográficas del área de distribución de la especie (México, Salvador, Costa Rica, Panamá, Colombia y Perú). Los análisis hallaron dos clados al interior *C. c. crocodilus* y de *C. c. fuscus/C. c. chiapasius*. Las relaciones entre *C. c. fuscus* y *C. c. chiapasius* no fueron claramente resueltas, ya que se presenta una división de estos dos grupos en dos linajes diferentes, uno de los cuales correspondió a *C. c. fuscus* y otro que corresponde a individuos de *C. c. fuscus* (Salvador) y de *C. c. chiapasius* (México). La presencia de haplotipos de ambas subespecies en el mismo clado se interpretó como producto de un evento de introgresión reciente. Estos resultados confirmaron la divergencia entre los linajes Mesoamericanos/Transandinos (C*. c. chiapasius y C. c. fuscus*) y caimanes Sudamericanos/Cisandinos (*C. c. crocodilus*). El tiempo de divergencia estimada entre *C. c. chiapasius/C. c. fuscus* de México y *C. c. fuscus* fue entre 2,5 y 2,9 millones de años, lo que corresponde con el cierre de la vía marítima del Pacífico-Caribe. Adicionalmente, se encontraron dos clados de *Caiman crocodilus crocodilus*, que según el Análisis de Clados Anidados, corresponderían a dos linajes evolutivamente independientes que hasta el momento la morfometría y taxonomía tradicional, no habían logrado encontrar.

Jimenez-Alonso, (2016) realizó un análisis filogenético de *Caiman crocodilus* en la Costa Caribe y Pacífica de Colombia, partiendo del supuesto de la presencia de las subespecies *C. c. fuscus* y *C. c. chiapasius* respectivamente. Para determinar las relaciones de parentesco filogenético, establecer la validez del estado taxonómico de las dos subespecies de *C. crocodilus* reconocidas en estas regiones del país y definir las unidades de conservación en las dos ecorregiones del país, usó los marcadores mitocondriales Citocromo Oxidasa I y Citocromo B en 78 individuos muestreados a lo largo de las dos costas. Los análisis encontraron que, las poblaciones de *Caiman crocodilus* distribuidas al oriente de los Andes en Colombia, en las regiones del Caribe, Pacifico, Catatumbo y Valle del Magdalena, están relacionadas con poblaciones del Sur de Costa Rica y Panamá, las cuales corresponden a la subespecie *C. c. fuscus*. Se observaron dos linajes de haplotipos que corresponden a: 1) Costa Atlántica: Catatumbo, Alto Magdalena, Norte del Chocó y 2) Pacifico colombiano: Urabá Antioqueño y la zona del Magdalena medio, lo cual aporta información clave para establecer planes de manejo de la especie.

3. METODOLOGÍA

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1 Selección de Localidades: La selección de las poblaciones objeto de estudio, se realizó teniendo en cuenta la información disponible en planes de manejo ambiental de humedales, evaluaciones de distribución y otros trabajos en los que se reporta la presencia de individuos de *Caiman crocodilus fuscus* en zonas puntuales del departamento del Tolima (Barahona et al., 2000; CORTOLIMA, 2015; CORTOLIMA, CORPOICA, & Universidad del Tolima, 2010; López Cruz, 2018; Reinoso Flórez, Villa, Losada, García Melo, & Vejarano, 2010). Adicionalmente se realizaron monitoreos nocturnos en diferentes municipios a lo largo del valle del alto Magdalena, haciendo barridos con iluminación de cuerpos de agua desde las 7:00 pm hasta las 12:00 pm a intervalos de una hora, en búsqueda del reflejo de los ojos de los animales (Figura 1), registrando el número de individuos avistados por barrido. Finalmente se obtuvieron reportes y avistamientos de la especie en un total de 9 localidades del departamento, estos puntos junto a la abundancia reportada por población se ilustran en la Figura 2.

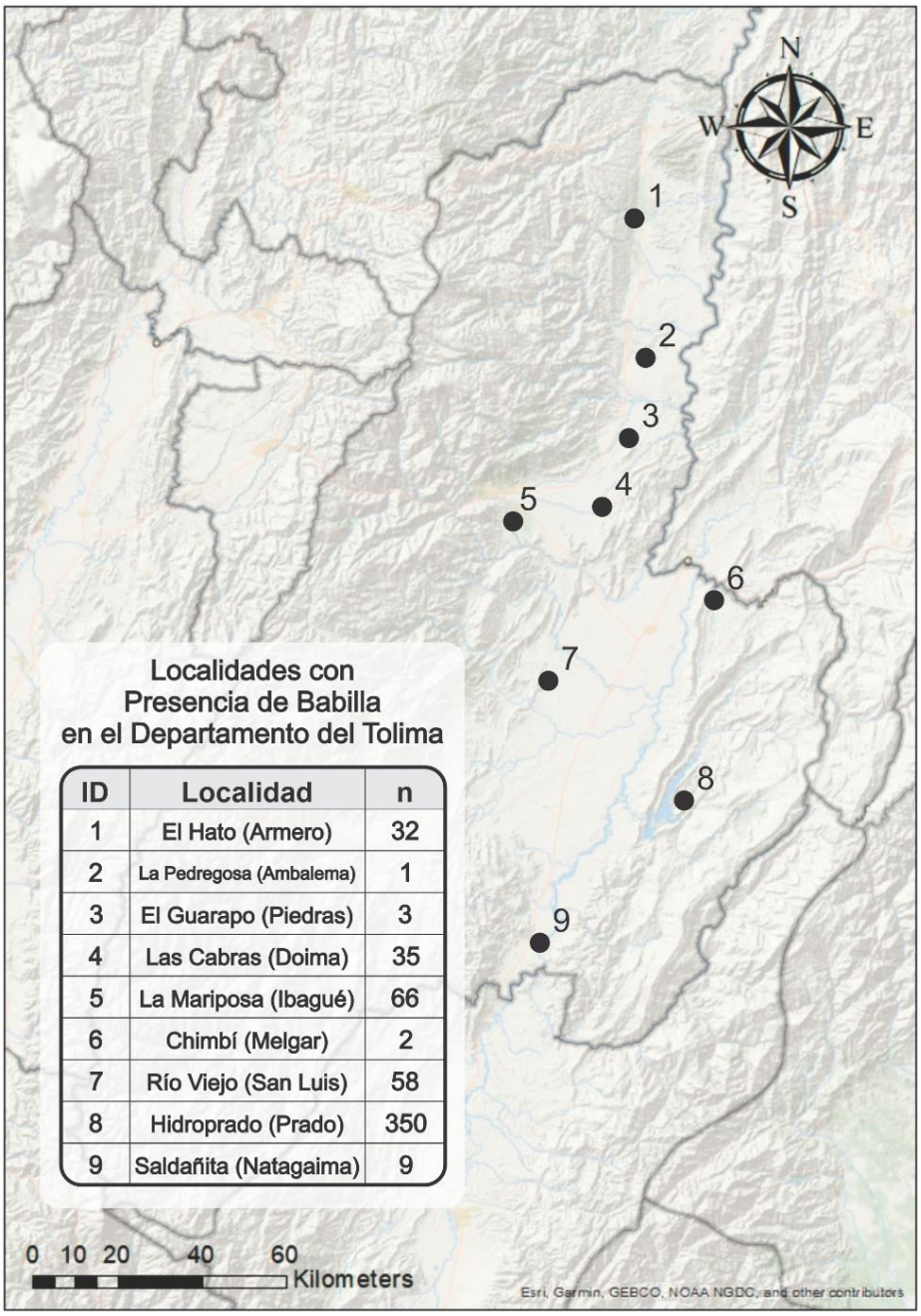
Figura 1. Reflejo de los ojos de *Caiman crocodilus* al ser iluminados con una linterna.



Fuente: Sergio Balaguera-Reina

La información recopilada fue cargada a las bases de datos iNaturalist y iCroc para su uso por otros investigadores (Balaguera-Reina, 2017; iNaturalist, 2019).

Figura 2. Número de individuos de *Caiman crocodilus fuscus* avistados o reportados por localidad en el Tolima.



Fuente: Autores

A raíz de la dificultad del proceso de colecta de los animales, fue necesario optimizar tiempo y recursos seleccionando los lugares con mayor número de individuos, donde la navegabilidad en bote no se viera afectada por factores bióticos como el buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) o árboles y arbustos con presencia de espinas con el potencial de afectar el bote. De igual manera se tomó en consideración para cada planeación de salidas de campo algunos factores abióticos que pueden tener un impacto en la tasa de captura como las lluvias (que imposibilitan el muestreo) o la luz de la luna (que permite a los animales ubicar a los investigadores y ocultarse ante cualquier acercamiento). Todo esto con la intención de elevar al máximo las probabilidades de captura de los animales.

Figura 3. Imagen mostrando como la alta concentración de macrófitas acuáticas imposibilita la navegación en bote en el municipio de Doima.

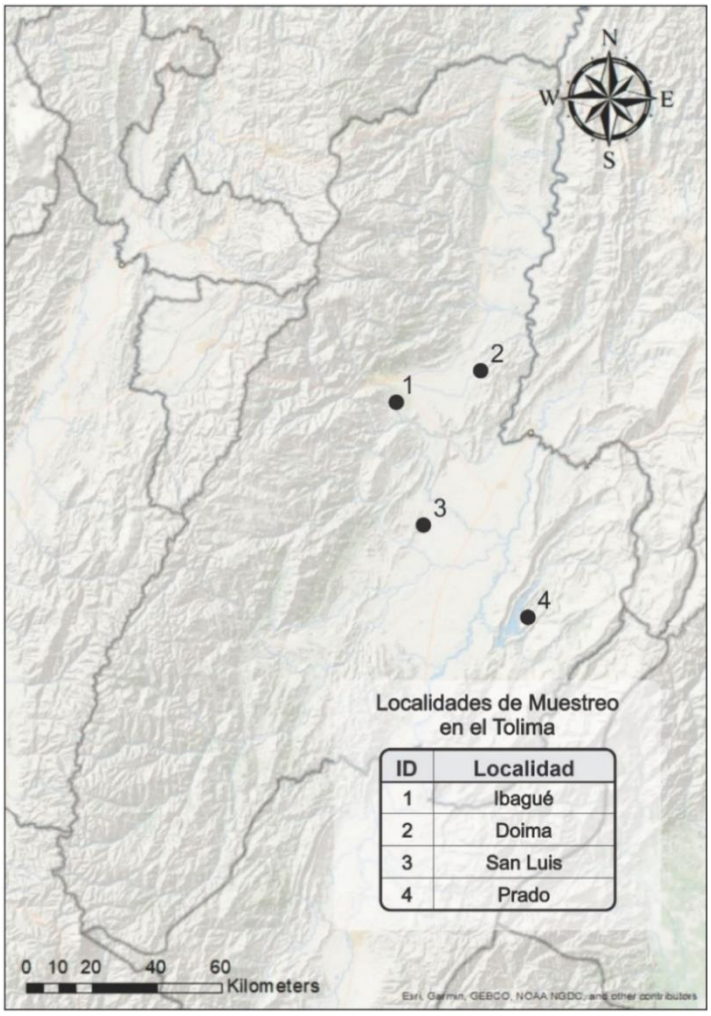


. Lugar: El Hato, Armero - Tolima

Debido al carácter comparativo y descriptivo de este estudio, se buscó obtener una representatividad geográfica, por lo que, al momento de seleccionar las poblaciones a muestrear, se tomó en consideración que cubrieran la mayor proporción posible del área del Valle del Alto Magdalena en el Tolima. Cabe resaltar que las actividades de campo se diseñaron teniendo en cuenta la resolución No. 02191 del 27 de noviembre del 2018 de la ANLA, por la cual se le otorga el Permiso Marco de Recolección a la Universidad del Tolima y dentro de ella al Grupo de Biología y Ecología de Artrópodos.

3.1.2 Localidades: Con base en lo anterior, se definieron las poblaciones de la laguna La Mariposa (Municipio de Ibagué), el humedal Río Viejo (Municipio de San Luís), el embalse de Hidroprado (Municipios de Prado, Cunday y Purificación) y la laguna Las Cabras (Municipio de Doima), como los puntos de muestreo, al cumplir con las características apropiadas para el trabajo de campo y permitir abarcar territorio norte, centro y sur del valle del alto magdalena. En este trabajo se hará referencia a las 4 poblaciones según el municipio o corregimiento al que pertenecen como se ilustra en la Figura 4.

Figura 4. Localidades de muestreo para colecta de babillas en el departamento del Tolima.



Fuente: Autores

3.1.2.1 Ibagué: La laguna La Mariposa se localiza en predios de la Hacienda Altamira, a 10 km del casco urbano del municipio de Ibagué. Posee un área aproximada de 5,4 ha y está ubicado a una altura de 883 m.s.n.m. Está compuesto por dos sub lagunas que desde una vista satelital asemejan la forma de una mariposa (de aquí el nombre) y dista unos 300 metros de la quebrada Guacarí, 2,6 km del río Opía y 5,8 km del río Combeima. En sus cercanías existen algunas lagunas de áreas similares, distribuidas por el sector de Picaleña a las afueras de Ibagué. Coordenadas: 4.394262, -75.125975

3.1.2.2 Doima: La laguna Las Cabras está ubicada en predios de la Hacienda del mismo nombre, a 1 km área urbana del corregimiento de Doima en el Municipio de Piedras. El área de la laguna es de 1 ha aproximadamente y se ubica a una altura de 579 m.s.n.m. El río Opía y la quebrada Doima son los cuerpos de agua lóticos más cercanos a la laguna, presentes a 0,8 y 2 km de ella, respectivamente. Otras lagunas de menor área pueden encontrarse en sus inmediaciones, pero la presencia de macrófitas imposibilitan tanto la navegación como el monitoreo. Coordenadas: 4.439719, -74.963117

3.1.2.3 San Luis: El Humedal Río Viejo se encuentra localizado en la reserva que lleva el mismo nombre, en el área del municipio de San Luis, departamento del Tolima y pertenece a la cuenca del río Luisa entre otros ríos con desembocadura directa al Magdalena. Su área es de 1,43 ha, está ubicado a una altura de 437 m.s.n.m. y la zona definida como la microcuenca del humedal posee un área de 19,15 ha (CORTOLIMA, 2015). A tan solo 350 m del humedal se encuentra el Río Luisa, que conecta al humedal con otros cuerpos de agua como un complejo lagunar a 10 km en el municipio del Guamo y el Río Magdalena, Coordenadas: 4.133140, -75.088756

3.1.2.4 Prado: La represa Darío Echandía o simplemente Hidroprado, es un embalse establecido en 1959, ubicado a 4 km de la cabecera municipal de Prado, municipio localizado en la región centro-oriental del departamento del Tolima. Cuenta con un área de 4200 ha lo que lo convierte en el cuerpo de agua léntico más grande del departamento. Se encuentra a una altura aproximada de 360 msnm y es abastecido por dos grandes ríos anteriormente tributarios del Magdalena, los ríos Cunday y Negro, los

cuales confluyen en la represa y al abrirse las compuertas crean el Río Prado, que desemboca en el Río Magdalena (Guevara, Lozano, Reinoso, & Villa, 2009; INVECOR & CGI, 2007; Ramírez & Grattz, 2012; Reinoso, Guevara, Vejarano, Garcia, & Villa, 2007). Coordenadas: 3.754429, -74.883988

3.2 TRABAJO DE CAMPO

El trabajo de campo fue desarrollado en horas de la noche, ingresando a los cuerpos de agua en bote y ubicando el reflejo naranja de los ojos de los especímenes con una linterna. La captura se realizó con pértigas y cuerdas para el caso de los animales más grandes (> 1m) y los más pequeños (< 1m) se atraparon con las manos (Figura 5). Durante una captura típica, se ubica a un animal con una lámpara y en el bote los investigadores se acercan lentamente hacia él. La persona que realiza la captura indica a quien conduce el bote la dirección y velocidad a la que debe moverse. La pértiga, que consiste en una vara larga con una guaya metálica en la punta en forma de aro, debe estar lista. A la distancia adecuada, con ayuda de la vara se enlaza la cabeza del animal mientras se iluminan sus ojos. Una vez la guaya está en posición, se cierra la misma halando de una cuerda y se permite que el animal se sumerja para evitar que luche, se lastime o ponga en riesgo a los investigadores (Figura 5).

Ya con el animal sumergido, se rema hacia la orilla tirando de la cuerda para llevar la babilla consigo. Cuando los investigadores están en una buena ubicación, se tira nuevamente de la cuerda para llevar el animal a tierra, donde se le cubre la cabeza, reduciendo sus sentidos, es allí cuando una persona se ubica tras el animal, lista para saltar y sujetar la cabeza, asegurándole las mandíbulas mientras otra persona sujeta la cola. La boca se aseguraba con suficiente cinta aislante. La musculatura de las mandíbulas de los crocodylianos les permite cerrar la boca con fuerza, pero poseen muy poca fuerza para la abertura (Godshalk, 2006). Ya restringido el animal se procede a realizar la toma de muestras de tejido, finalmente se libera al animal en el sitio y se repite el proceso.

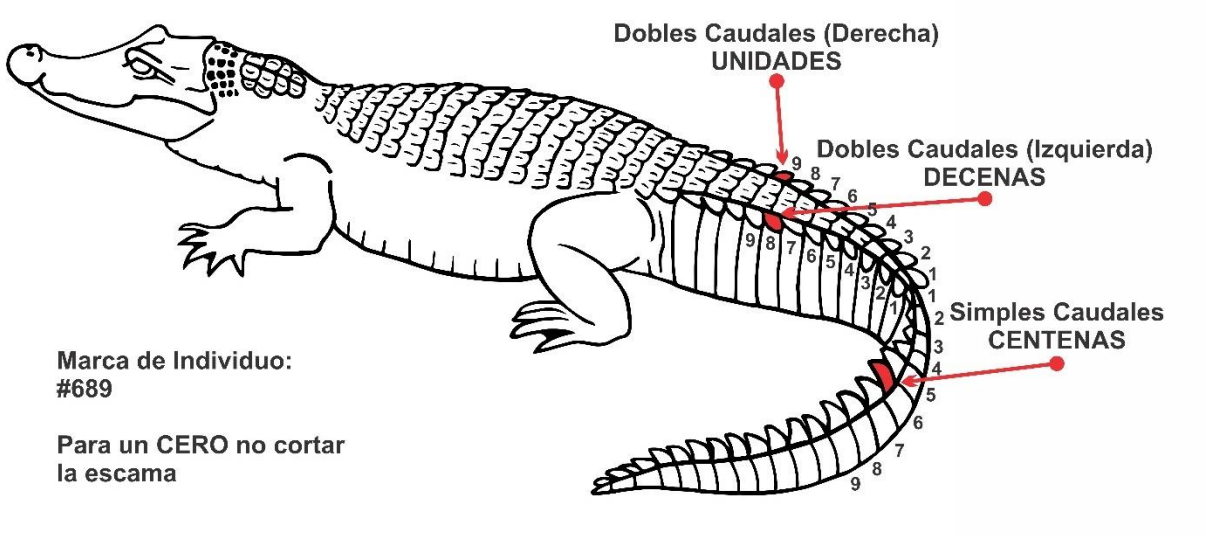
Figura 5. Captura de individuos de *Caiman crocodilus* mediante pértiga (arriba) y manual (abajo).



Fuente: Cristina Mora-Rivera

3.2.1 Toma De Muestras Para Análisis Genéticos: Los glóbulos rojos de los reptiles están nucleados de manera que la sangre representa una muestra rica en ADN y de fácil extracción que implica una mínima intrusión en el animal vivo (Godshalk, 2006). Por esta razón, la mayoría de las muestras empleadas en este estudio fueron de sangre. Cada espécimen se marcó según la metodología descrita en Morales-Betancourt et al., (2013) y Seijas, (2011) en la cual se cortan hasta tres escamas caudales para evitar recapturas inadvertidas de individuos (Figura 6).

Figura 6. Metodología de marcaje de crocodylianos mediante corte de escamas caudales.



Fuente: Autores

El tejido producto del marcaje se almacenó en frascos con etanol al 96%. De igual forma, de cada individuo se colectó de 1 a 2 mL de sangre de la vena caudal o nucal en tubos con EDTA (Figura 7). Las muestras se conservaron en neveras de icopor refrigeradas hasta llegar al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Ibagué donde se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la extracción de ADN. Los datos de colecta fueron cargados al Sistema de Información de la Biodiversidad bajo el certificado de reporte No. 16C7330414C.

Figura 7. Marcaje y toma de muestra en escamas caudales de *Caiman crocodilus.*



Fuente: Cristina Mora-Rivera

3.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Todas las extracciones de ADN fueron realizadas utilizando el protocolo modificado de extracción por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Se tomaron aproximadamente 10 µL de la muestra de sangre o en su defecto 20 mg de muestra de escama para cada extracción. En el caso de las muestras de escama se procuró cortar tejido de la zona más interior de la escama, con mayor proporción de músculo y menor de tejido adiposo o conjuntivo (Cornejo Romero, Serrato Díaz, Rendón

Aguilar, & Rocha Munive, 2014). Para realizar la lisis celular, la muestra se depositó en un microtubo de 1,5 mL y se le adicionó 25 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) y 475 µL de buffer de lisis (50 mM de Tris-HCL pH 8,0, 50 mM de EDTA pH 8,0, 1 % (p/v) SDS, 50 mM de NaCl) esto se incubó al baño maría por 24 horas a 55 °C. Para la separación de lípidos y proteínas luego de la lisis celular, se adicionó 500 µL de Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico (PCI) a una proporción de 25:24:1, el cual funcionó como un agente quelante debido a que separa las proteínas del material genético (McKiernan & Danielson, 2016). Para lograr esto se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos, luego, se transfirió cuidadosamente la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo donde se repitió este paso una vez más. Para la purificación del ADN, se adicionó a la fase acuosa 500 µL de Cloroformo Alcohol Isoamílico (CI), el cual se unió a las moléculas de fenol que, al centrifugarse durante 1 minuto a 10.000 rpm, se precipitó permitiendo que el material genético quedara en la fase superior y de esta forma fuera más fácil transferirlo a un nuevo tubo. En este nuevo tubo se añadió 600 µL de etanol frio al 100%, se mezcló bien hasta que se formó una suerte de nube blanca (el ADN) y se incubó a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó durante 20 minutos a 15.000 rpm para que se formara el pellet y este se precipitara, permitiendo eliminarlo mediante inversión el etanol, luego se adicionó 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 15.000 rpm por 20 minutos, eliminando luego el etanol mediante inversión. El pellet se dejó secar hasta que el etanol restante se evaporó para luego ser hidratado con 50 µL de TE pH 8 (1 M de Tris HCL pH 8,0 y 0,5 M de EDTA pH 8,0).

La cantidad y calidad del ADN se midió mediante el Fluorímetro Qubit 4 (Invitrogen) y por espectrofotómetro NanoDrop. Este último se realizó en el Laboratorio de Investigación en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima. Se realizó un filtrado de las muestras a utilizar para los análisis subsecuentes, en función de su concentración (solo muestras > 10 µg/µL) y las relaciones de la absorbancia de luz 260/280 (valores entre 1,8 y 2 indican poca o nula presencia de ARN o Proteínas) y 260/230 (valores superiores a 1,5 indican ausencia de compuestos aromáticos como fenoles que inhiben la PCR y la secuenciación) (Hiesinger, Lôffert, Ritt, & Oelmûller, 2001).

3.4 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se amplificaron los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa 1 (*COI*) y Citocromo B (*CytB*) utilizando los siguientes primers:

Tabla 2. Primers para la amplificación de los genes *COI* y *CytB* en *Caiman crocodilus*.

Gen	Primer	Secuencia	Longitud	Autor
COI	*COI*a	5´ - AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC - 3´	650 pb	(Palumbi, 1991)
	*COI*f	5´ - CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC - 3´		
CytB	Ccr_GluL1T	5´ - GTCTGAAAAACCCCCGTTG - 3´	1200 pb	(Jimenez-Alonso, 2016)
	Ccr_ThrH1T	5´ - CCCGTCTCTGTCTTACAAGG - 3´		

Las condiciones para las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) de ambos marcadores mitocondriales de la totalidad de muestras fue la siguiente: se usó 22 µL de agua tipo MiliQ, 25 µL de 2X PCR Taq Master Mix (ABM), 1 µL de cada *primer* (Forward y Reverse) y 1 µL de muestra de ADN, para un volumen total de 50 µL. La amplificación de ambos genes se llevó a cabo con las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes *COI* y *CytB.*

Genes	Stage 1	Stage 2 (x35)	Stage 3
COI y CytB	94°C x 2:00	94 °C x 0:30 53°C x 0:30 72°C x 0:30	72°C x 10:00 4°C x ∞

Finalmente, los productos de amplificación fueron cuantificados vía Fluorímetro Qubit 4 para corroborar que tuvieran una concentración de ADN superior a 100 ng/µL y se enviaron volúmenes de 40 µL por producto a *SSigMol* en la Universidad Nacional de Colombia para su secuenciación vía Applied Biosystems 3730XL Sanger Sequencer.

3.5 EDICIÓN DE SECUENCIAS

Posterior a la secuenciación, los archivos en formato AB1 fueron visualizados mediante el programa Geneious Prime (Kearse et al., 2012) para identificar el control de calidad (QC), con el objetivo de descartar secuencias completas o parciales menores al 70% de QC. Una vez las secuencias fueron depuradas se realizó un alineamiento múltiple usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa Geneious Prime (Kearse et al., 2012) usando como referencia el genoma mitocondrial de *Caiman crocodilus* (Accession Number: NC_002744) y las secuencias de *C. crocodilus fuscus* y *C. crocodilus crocodilus* de Venegas-Anaya et al., (2008) que se ilustran en la Tabla 4. Una vez editados los contigs Forward y Reverse, se generaron las secuencias consenso de los dos marcadores por individuo y finalmente se concatenaron para su análisis.

3.6 SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS

3.6.1 Secuencias del GenBank: Se emplearon 94 secuencias correspondientes a los genes *COI* y *CytB* de 47 individuos de la publicación de Venegas-Anaya et al., (2008). Las subespecies y origen geográfico de cada individuo se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de referencia y origen obtenidas del GenBank.

Especie	**País**	**Localidad**	***COI***	***CytB***
C. c. fuscus	Costa Rica	Río San Juan	EU260416	EU496817
C. c. fuscus	Costa Rica	Río San Juan	EU260417	EU496818
C. c. fuscus	Costa Rica	Río San Juan	EU260418	EU496819
C. c. fuscus	Costa Rica	Río Sarapiquí	EU260419	EU496820
C. c. fuscus	Costa Rica	Río Sarapiquí	EU260420	EU496821
C. c. fuscus	Salvador	Río Cara Sucia	EU260421	EU496822
C. c. fuscus	Salvador	Río Cara Sucia	EU260422	EU496823
C. c. fuscus	Salvador	Río Cara Sucia	EU260423	EU496824
C. c. fuscus	Salvador	San Salvador	EU260424	EU496825
C. c. fuscus	Salvador	San Salvador	EU260425	EU496826

Especie	País	Localidad	*COI*	*CytB*
C. c. fuscus	Salvador	San Salvador	EU260426	EU496827
C. c. fuscus	Salvador	San Salvador	EU260427	EU496828
C. c. fuscus	Costa Rica	Río Parrita	EU260428	EU496829
C. c. fuscus	Costa Rica	Río Parrita	EU260429	EU496830
C. c. fuscus	Costa Rica	Río Parrita	EU260430	EU496831
C. c. fuscus	Costa Rica	Río Parrita	EU260431	EU496832
C. c. fuscus	Panamá	Río Armila	EU260432	EU496833
C. c. fuscus	Panamá	Río Armila	EU260433	EU496834
C. c. fuscus	Panamá	Río Armila	EU260434	EU496835
C. c. fuscus	Colombia	Río Magdalena	EU260435	EU496836
C. c. fuscus	Panamá	Río Tuira	EU260436	EU496837
C. c. fuscus	Panamá	Río San San	EU260437	EU496838
C. c. fuscus	Panamá	Río San San	EU260438	EU496839
C. c. fuscus	Panamá	Río Balsa	EU260439	EU496840
C. c. fuscus	Panamá	Río La Maestra	EU260440	EU496841
C. c. fuscus	Panamá	Río San Juan	EU260441	EU496842
C. c. fuscus	Panamá	Can. de Panamá	EU260442	EU496843
C. c. fuscus	Panamá	Can. de Panamá	EU260443	EU496844
C. c. fuscus	Panamá	Río Chagres	EU260447	EU496848
C. c. fuscus	Panamá	Río San Juan	EU260448	EU496849
C. c. fuscus	Panamá	Río San Juan	EU260449	EU496850
C. c. crocodilus	Perú	Río Quistococha	EU260450	EU496851
C. c. crocodilus	Perú	Río Quistococha	EU260451	EU496852
C. c. crocodilus	Perú	Río Ucayalí	EU260452	EU496853
C. c. crocodilus	Perú	Río Ucayalí	EU260453	EU496854
C. c. crocodilus	Perú	Río Ucayalí	EU260454	EU496855
C. c. crocodilus	Perú	Río Ucayalí	EU260455	EU496856
C. c. crocodilus	Perú	Río Amazonas	EU260456	EU496857
C. c. crocodilus	Perú	Río Quistococha	EU260457	EU496858
C. c. crocodilus	Perú	Río Quistococha	EU260458	EU496859

Especie	País	Localidad	*COI*	*CytB*
C. c. crocodilus	Perú	Río Quistococha	EU260459	EU496860
C. c. crocodilus	Perú	Río Quistococha	EU260460	EU496861
C. c. chiapasius	México	Tapachula	EU260444	EU496845
C. c. chiapasius	México	Tapachula	EU260445	EU496846
C. c. chiapasius	México	Tapachula	EU260446	EU496847
Paleosuchus trigonatus	Perú	Río Ucayalí	EU260461	EU496862
Alligator mississippiensis	USA	No Info.	EU260462	EU496863

3.6.2 Secuencias de Casanare: Para complementar los análisis filogenéticos, se emplearon 7 secuencias de *Caiman crocodilus crocodilus*, procedentes del municipio de Palmarito en el departamento de Casanare donadas por el Dr. Rafael Antelo, director científico de la Fundación Palmarito. Las muestras siguieron el mismo procesamiento descrito para las muestras del Tolima.

3.7 ANÁLISIS DE DATOS

3.7.1 Diversidad Genética, Diferenciación Poblacional e Historia Demográfica de *Caiman crocodilus fuscus* en el Tolima: Con la finalidad de analizar los patrones de distribución de la variación genética encontrada en el Tolima se calcularon los siguientes parámetros para cada una de las poblaciones en cada gen por separado y concatenados: Sitios polimórficos (*S*), diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (*h*) y número de haplotipos (#*H*), mediante el programa DnaSP 6.12 (Rozas et al., 2017). Además, se evaluó la representatividad de los haplotipos encontrados mediante una curva de acumulación basada en los intentos de captura de individuos y aparición de haplotipos, en el programa EstimateS 9.1 (Colwell, 2014). Se estimó el estadístico *Fst* pareado (Hudson, Slatkin, & Maddison, 1992 ecuación 3) en el programa ARLEQUIN 3,5 (Excoffier & Lischer, 2010), para estimar el grado de diferenciación poblacional entre las localidades muestreadas. (Arenas-Calle & García-Merchán, 2011; Caldera, Jaramillo, Cochero, Pérez-Doria, & Bejarano, 2013; Richard R. Hudson, 2000; Rozas, 2009; Rozas et al., 2017; Wright, 1951). Finalmente, para evaluar si el patrón de polimorfismo

observado en las secuencias corresponde con lo esperado bajo la teoría neutral de la evolución molecular o si se pueden hallar evidencias de expansiones/contracciones poblacionales con estos marcadores, se realizaron las pruebas: D de Tajima y D y F de Fu y Li en el programa DnaSP 6.12 (Caldera et al., 2013; Fu & Li, 1993; Hartl & Clark, 1997; Rozas, 2009; Rozas et al., 2017; Tajima, 1984).

3.7.2 Relaciones genealógicas intra e interpoblacionales de la babilla en el Tolima: Se realizó un alineamiento MUSCLE en el programa Geneious Prime (Edgar, 2004; Kearse et al., 2012) con las secuencias concatenadas de los genes *COI* y *CytB* de 21 individuos del Tolima, 7 del Casanare, 1 de *Paleosuchus trigonatus* y 1 de *Alligator mississippiensis* citados en la Tabla 4. Esta matriz de 30 secuencias con 1614 pares de bases fue dividida en seis particiones vía DnaSP 6.12 (Rozas et al., 2017) correspondientes a *i*) todas las primeras posiciones codónicas de *COI, ii*) todas las segundas posiciones codónicas de *COI, iii*) todas las terceras posiciones codónicas de *COI, iv*) todas las primeras posiciones codónicas de *CytB, v*) todas las segundas posiciones codónicas de *CytB y vi*) todas las terceras posiciones codónicas de *CytB*. Estos seis alineamientos en formato NEXUS se analizaron vía JModelTest 2 (Darriba et al., 2012) para establecer el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para cada uno utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC). Con esta información se realizaron filogenias moleculares con los algoritmos de Inferencia Bayesiana (IB), Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV). IB fue realizado en el programa MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012), aplicando los respectivos modelos de sustitución a cada partición (por gen y por posición codónica) generando un total de 10 millones de cadenas de Markov-Montecarlo con 4 cadenas ejecutándose en simultaneo y con una tasa de muestreo de árboles de 1 en cien generaciones. Los análisis de Máxima Verosimilitud se realizaron la herramienta online W-IQ-TREE (Trifinopoulos, Nguyen, von Haeseler, & Minh, 2016) con el método de remuestreo de bootstrap de 10000 réplicas y un máximo de 10000 iteraciones aplicando también los modelos de sustitución establecidos para cada partición. Finalmente, la reconstrucción vía Máxima Parsimonia se realizó en PAUP 4.0a166 (Swofford, 2017), usando el algoritmo de bisección y reconexión de árboles (Tree-Bisection-Reconection, TBR), con el que se hicieron 10000 réplicas; conservando 1000 árboles para el muestreo y

realizando un consenso estricto de los árboles producto del muestreo. Un alineamiento adicional, que contuvo solo las 28 secuencias de *Caiman crocodilus* del Tolima y Casanare, fue empleado para construir una red de haplotipos en el programa PopArt (Leigh & Bryant, 2015) usando el algoritmo TCS (Clement et al., 2000), con la finalidad de visualizar con una mayor resolución las relaciones dentro y entre las poblaciones del Tolima y su distancia genética con las del Casanare.

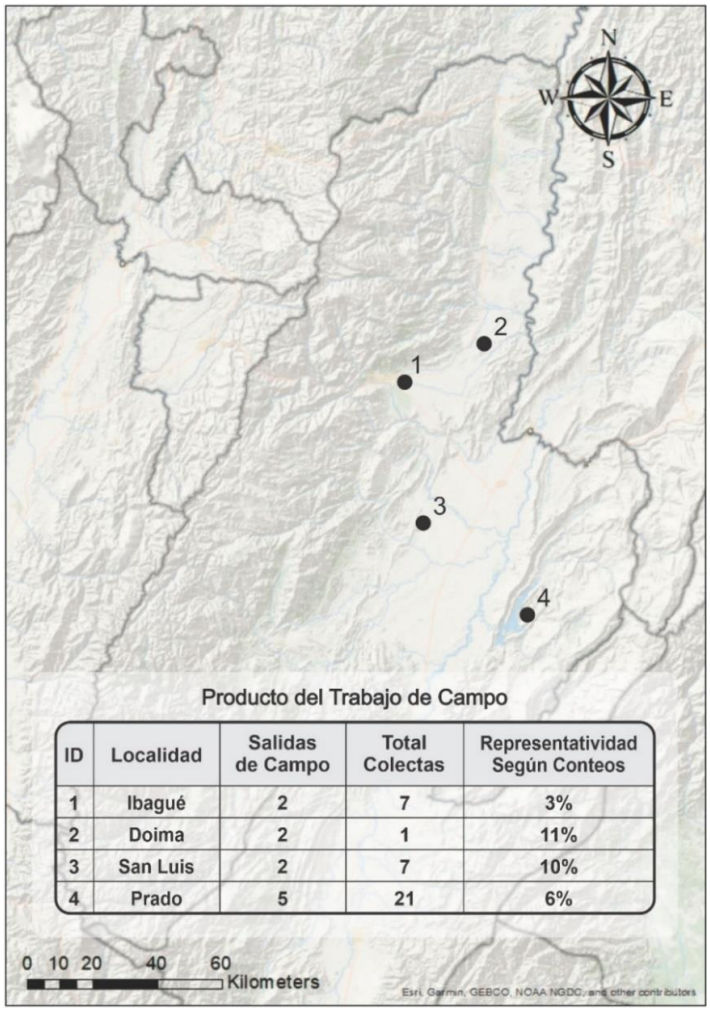
3.7.3 Relaciones filogenéticas y filogeográficas de las poblaciones de babilla del Tolima: Se realizó un alineamiento MUSCLE en Geneious Prime (Edgar, 2004; Kearse et al., 2012) con las secuencias concatenadas de los genes *COI* y *CytB* de los 45 individuos de *Caiman crocodilus,* 1 de *Paleosuchus trigonatus* y 1 de *Alligator mississippiensis* de Venegas-Anaya et al., (2008) más los 21 *C. crocodilus fuscus* del Tolima y los 7 *C. crocodilus crocodilus* del Casanare para un alineamiento final de 75 secuencias y una longitud de 1614 pares de bases. De manera similar al punto anterior, se establecieron los mejores modelos de sustitución de nucleótidos para cada posición codónica en cada gen y se construyeron filogenias por los métodos de Inferencia Bayesiana, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud como se realizó anteriormente. Así mismo, se creó una red de haplotipos mediante el algoritmo TCS en PopArt (Clement et al., 2000; Leigh & Bryant, 2015). Para establecer las relaciones filogeográficas entre las secuencias se realizó un análisis filogeográfico de clados anidados o NCPA por sus siglas en inglés (Nested Clade Phylogeographic Analysis) en el programa ANeCA 1.2 (Panchal, 2006), Se generaron los archivos que contenían las distancias de los clados (*Dc*) y la distancia del clado anidado (*Dn*) en GEODIS 2.2 (Posada, Crandall, & Templeton, 2000). Los datos de distancias entre localidades fueron calculados en Google Earth, y el radio (dispersión) se calculó midiendo la distancia entre los dos individuos más distantes dentro de una localidad (o midiendo hasta un individuo no capturado, pero registrado visualmente como en Viloria-Lagares, (2017)). Por último, se calculó la significancia de las distancias y los valores de distribución de cada localidad en ANeCA 1.2, (Panchal, 2006) usando 10.000 permutaciones, un valor de significancia de 0,05 y distancias de radios definidas entre los puntos (individuos) más distantes de cada localidad. Aquellos clados con valores significativos fueron pasados por la clave de inferencia de Templeton, (2004).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 GENERALIDADES

4.1.1 Trabajo de Campo: Se colectaron 36 individuos de *Caiman crocodilus fuscus* a lo largo del departamento del Tolima en las localidades de Ibagué, San Luis, Doima y Prado, el número de individuos colectados por población, el número de salidas de campo y la representatividad calculada con base en la estimación poblacional, se resume en la Figura 8.

Figura 8. Individuos de babilla colectados en cuatro poblaciones del Tolima.



ID	Localidad	Salidas de Campo	Total Colectas	Representatividad Según Conteos
1	Ibagué	2	7	3%
2	Doima	2	1	11%
3	San Luis	2	7	10%
4	Prado	5	21	6%

Fuente: Autores

Los monitoreos, que aunque por los objetivos del presente trabajo, no contaron con la rigurosidad metodológica de otros autores (Balaguera-Reina & González-Maya, 2009; Moreno-Arias et al., 2013), permitieron encontrar áreas del departamento con un número importante de individuos de babilla. A conocimiento de los autores, este es el primer trabajo en el que se recopila y produce este tipo de información para la especie en el Tolima; solo se contaba con un trabajo que evaluó en términos de abundancia, las poblaciones de babilla del departamento y tan solo reportaron 15 individuos en la represa de Prado (Barahona et al., 2000). La anterior resultó ser la población más numerosa del departamento y se encuentra en el posible hábitat continuo más grande del Tolima que estos animales puedan aprovechar. Se tiene conocimiento de que la primera evaluación del estado poblacional, distribución y evaluación de hábitat para la especie en el departamento, se está desarrollando en este momento y permitirá obtener una mejor perspectiva de la importancia de este hábitat para el manejo y conservación de la babilla en el Tolima (Mora-Rivera, n.d.).

4.1.2 Secuencias Obtenidas: Se logró amplificar y obtener secuencias de alta calidad de los genes *COI* y *CytB* en cerca del 60% de las muestras colectadas en el Tolima (n = 21 individuos) manteniendo un equilibrio en el número de individuos por población (7 por localidad) y una longitud de secuencias comparable al de otros autores (618 pb para *COI* y 1032 pb para *CytB*) (Farias et al., 2004; Vasconcelos et al., 2006; Venegas-Anaya et al., 2008). Estos mismos autores reportan una baja eficiencia en la amplificación de estos dos genes debido a su alto polimorfismo, lo que podría explicar los resultados obtenidos. Tanto para el gen *COI* como para *CytB*, la mayoría de los sitios polimórficos fueron encontrados en la tercera posición codónica, comportamiento similar a lo reportado por Venegas-Anaya et al., (2008). Las secuencias obtenidas por este trabajo representan las primeras para la especie en el Tolima y complementan las secuencias sin publicar de la vertiente occidental de la cordillera oriental, obtenidas por Jimenez-Alonso, (2016), correspondientes a la subespecie *Caiman crocodilus fuscus*. Las 7 secuencias del Casanare por su parte son las únicas que, a conocimiento de los autores, existen para los individuos de la especie ubicados en la vertiente oriental de la misma cordillera en el país y que corresponden a la subespecie *Caiman crocodilus crocodilus*. Si se tiene en

cuenta la hipótesis sobre la separación entre subespecies causada por el surgimiento de la cordillera (Jimenez-Alonso, 2016; Venegas-Anaya et al., 2008) es importante tener secuencias de ambas vertientes de la cordillera para hacer inferencias filogeográficas apropiadas y las secuencias de este estudio (Tolima y Casanare) resultan ser las más cercanas a la cordillera y entre sí, ya que anteriormente se contaba solo con secuencias de Perú, Brasil y Guyana Francesa (Vasconcelos et al., 2006; Venegas-Anaya et al., 2008).

4.2 DIVERSIDAD GENÉTICA, DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE *Caiman crocodilus fuscus* EN EL TOLIMA

Al analizar únicamente las secuencias del gen *COI,* se observó un total de 614 sitios invariables y 4 sitios polimórficos (S), de ellos 3 fueron parsimoniosamente informativos y 1 no informativo, 2 corresponden a mutaciones sinónimas y 2 a mutaciones no sinónimas. En cuanto a las secuencias del gen *CytB* fueron encontrados 1024 sitios invariables y 8 sitios polimórficos (S), de estos 6 son parsimoniosamente informativos y 2 no informativos, de estas 5 fueron sinónimas y 3 no sinónimas. Al concatenar los genes *COI y CytB* se observaron 1638 sitios invariables y 12 sitios polimórficos (*S*), de los cuales 9 fueron parsimoniosamente informativos y 3 no informativos, 7 corresponden a mutaciones sinónimas y 5 a mutaciones no sinónimas. Se encontraron 12 haplotipos únicos en los individuos colectados de *Caiman crocodilus fuscus* en el Tolima y para *Caiman crocodilus crocodilus*, se encontraron 4 haplotipos únicos en el Casanare, los primeros para esta subespecie en el país. Los haplotipos más frecuentes en el Tolima fueron los haplotipos HD Ccf 08 (n = 4) que fue el único compartido entre localidades (Ibagué y Prado, Figura 9), seguido por los haplotipos HD Ccf 03 (n = 3) y HD Ccf 12 (n = 4). En el Casanare el haplotipo más frecuente fue HD Ccc 15 (n = 4). La posición de cada sitio variable por departamento se resume en las tablas 5 y 6. La distribución poblacional de estos haplotipos se ilustra en los mapas de la figura 9.

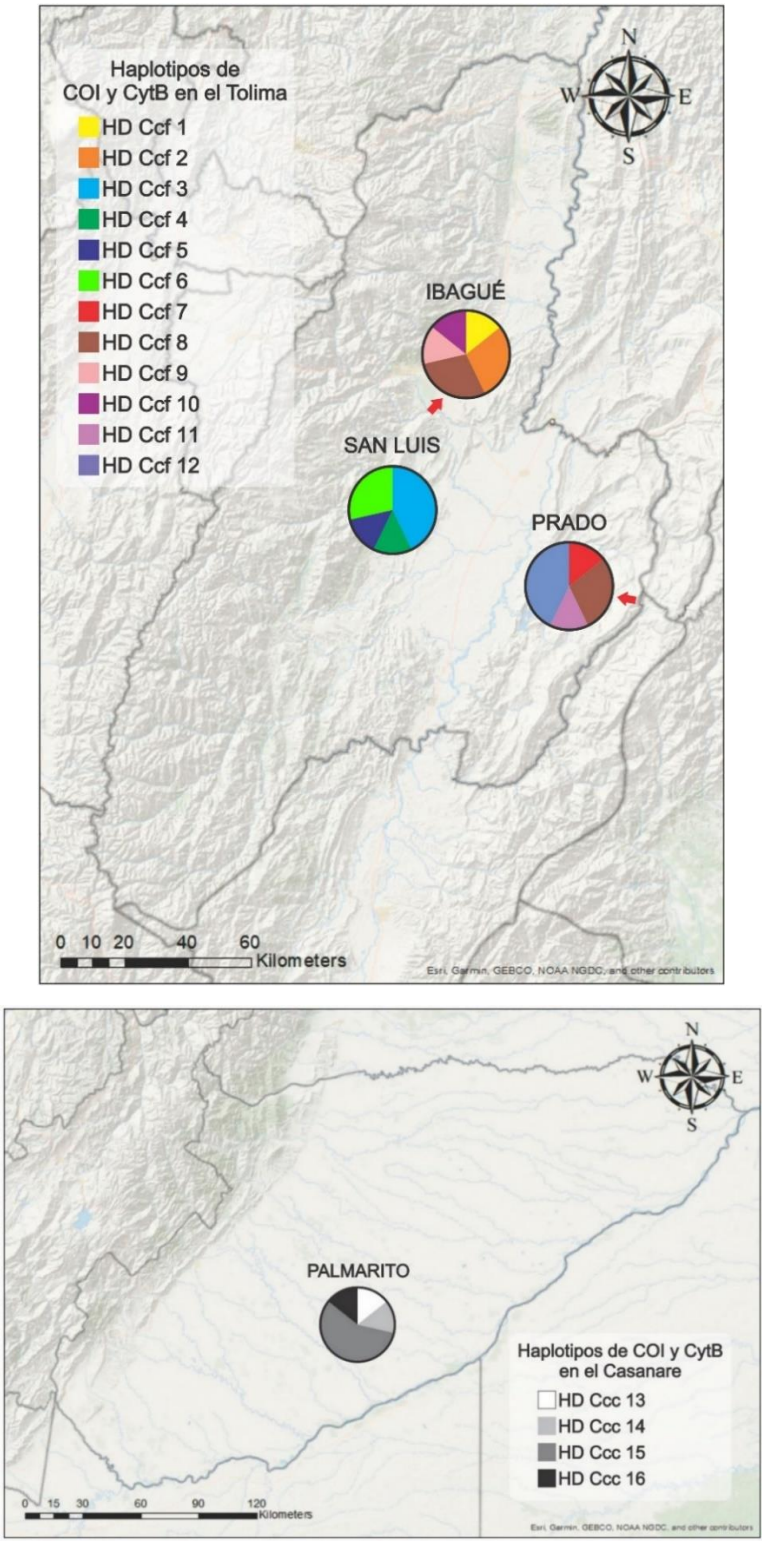
Tabla 5. Polimorfismos de las posiciones variables que componen los 12 haplotipos del Tolima para los genes *COI* y *CytB* concatenados de *C. crocodilus fuscus.*

Haplotipos	Número de Posición Variable												N
	COI				*CytB*								
	25	155	156	507	750	934	1017	1216	1240	1302	1474	1591	
HD Ccf 1	T	C	T	T	G	G	A	A	A	C	T	G	1
HD Ccf 2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	C	A	2
HD Ccf 3	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	C	A	3
HD Ccf 4	C	T	C	·	·	·	·	·	·	·	C	A	1
HD Ccf 5	·	T	C	·	·	·	·	·	G	·	C	A	1
HD Ccf 6	·	T	C	·	·	·	·	·	·	·	C	A	2
HD Ccf 7	·	·	·	·	A	·	·	G	·	A	·	A	1
HD Ccf 8	·	·	·	·	A	·	·	G	·	A	·	·	4
HD Ccf 9	·	·	·	·	·	·	·	G	G	A	·	·	1
HD Ccf 10	·	·	·	·	A	·	·	G	G	A	·	·	1
HD Ccf 11	·	·	·	C	A	A	G	G	·	·	·	·	1
HD Ccf 12	·	·	·	C	A	·	·	G	·	·	·	·	3

Tabla 6. Polimorfismos de las posiciones variables que componen los 5 haplotipos del Casanare para los genes *COI* y *CytB* concatenados de *C. crocodilus crocodilus.*

Haplotipos	Número de Posición Variable					n
	COI	*CytB*				
	18	873	882	964	1053	
HD Ccc 13	T	T	T	G	A	1
HD Ccc 14	C	·	·	·	G	1
HD Ccc 15	C	C	C	A	·	4
HD Ccc 16	C	C	C	·	·	1

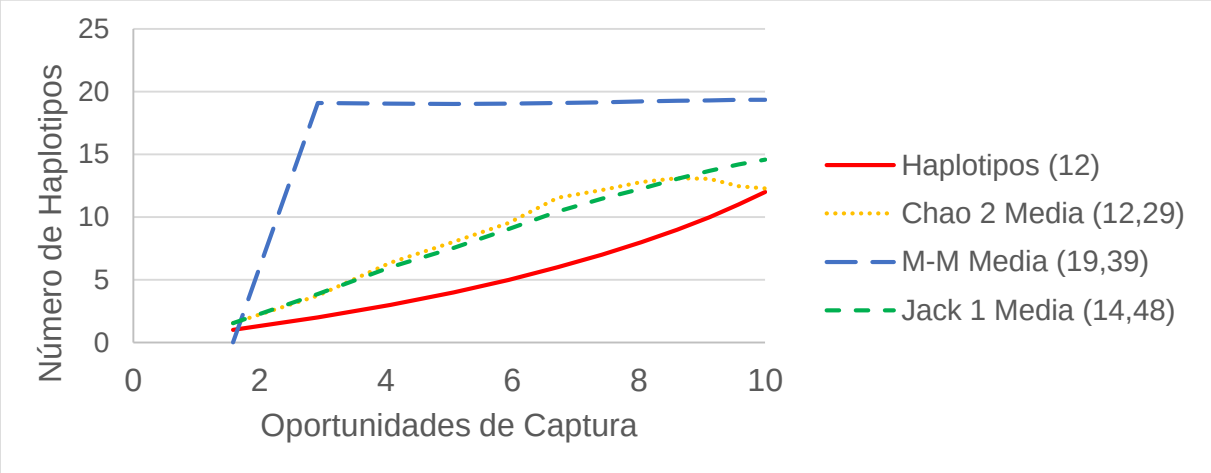
Figura 9. Ubicación de los 12 haplotipos de *Caiman crocodilus fuscus* en el Tolima (arriba) y de los 4 haplotipos de *C. crocodilus crocodilus* en el Casanare (abajo).



Fuente: Autores

En base a la diversidad genética encontrada y al ritmo de captura descrito en la curva de acumulación de haplotipos (Figura 10), se registra un valor entre el 62% y el 98% de la diversidad genética esperada para los marcadores *COI* y *CytB* en los sitios muestreados. Esto indica una alta representatividad muestreal, similar a la presentada por otros autores como Jimenez-Alonso, (2016) que reportó para Colombia 19 haplotipos únicos de la subespecie *Caiman crocodilus fuscus* y por su tasa de captura, logró recuperar alrededor del 50% de los haplotipos que se esperaba para su área de muestreo (las poblaciones transandinas de Colombia). Sin embargo, valdría la pena ampliar la zona de muestreo para cubrir mejor la zona norte del valle del alto magdalena, así como incluir muestras del Huila para la zona sur. Dichos análisis, evidencian que, a pesar de tener un N muestreal bajo, estas muestras son representativas de las poblaciones bajo estudio.

Figura 10. Curva de acumulación de haplotipos de los marcadores *COI* y *CytB* que ilustra los haplotipos encontrados y esperados en el Tolima bajo tres estadísticos.



Fuente: Autores

Adicionalmente, estos nuevos haplotipos constituyen un incremento significativo en el conocimiento de la diversidad genética de la especie en el país y especialmente en el departamento, donde anteriormente no se contaba con información de este tipo. Otros autores encontraron 23 haplotipos únicos en la especie en Mesoamérica, pero ya que no se conoce ni su tasa de captura ni los estadísticos de diversidad genética, no se puede

establecer si hay mayor diversidad haplotípica en Colombia que en Centro y Mesoamérica (Jimenez-Alonso, 2016; Venegas-Anaya et al., 2008).

En la tabla 7 se muestran los resultados del análisis de diversidad genética: los sitios polimórficos (*S*), diversidad haplotípica (*h*), diversidad nucleotídica (π), número de haplotipos (#*H*) y número de sustituciones (*Sus*) ya sean sinónimas (Sin) o no sinónimas (No Sin) en cada una de las poblaciones.

Tabla 7. Estadísticos de diversidad genética para las poblaciones de babilla del Tolima.

Población	***n***	***#H***	***h***	***π***	***S***	***Sus***
Ibagué	7	5	0,905	0,00190	6	2 Sin, 4 No Sin
San Luis	7	4	0,810	0,00069	3	1 Sin, 2 No Sin
Prado	7	4	0,810	0,00121	5	3 Sin, 2 No Sin
Tolima	21	12	0,933	0,00255	12	5 Sin, 7 No Sin

Estos análisis evidencian una alta diversidad genética de *Caiman crocodilus* en el Tolima (*h*= 0,933 π= *0,00255*). Dentro del departamento la población de Ibagué obtuvo los valores más altos de variabilidad genética, representado no solo por los índices de diversidad (*h* y π) y un mayor número de polimorfismos (*S*) sino por una mayor cantidad de mutaciones no sinónimas respecto a las demás poblaciones.

Por otra parte los valores de diversidad haplotípica del departamento fueron mayores que los reportados por Farias et al., (2004) y Vasconcelos et al., (2006) en la Amazonía para *C. crocodilus crocodilus* (*h* = 0,692 y 0,733 respectivamente); sin embargo, estos autores poseen un mayor número de muestras, distribuidas en un área mucho mayor (desde Perú, hasta Guyana Francesa), lo que puede influenciar esta diferencia. No se logró comparar este valor con los de otros autores que estudiaron la subespecie *C. crocodilus fuscus*, ya que estos índices de diversidad no se muestran en sus publicaciones (Jimenez-Alonso, 2016; Venegas-Anaya et al., 2008).

En otras especies del orden Crocodylia, como *Crocodylus siamensis*, *Crocodylus porosus* y *Crocodylus acutus*, se ha encontrado una diversidad haplotípica incluso mayor utilizando el marcador mitocondrial *D-Loop*, por lo que la creación de primers para el uso de este gen en la complementación de los estudios de diversidad genética de *Caiman crocodilus* podría ser un importante paso para reforzar estos análisis (Lapbenjakul et al., 2017; Milián-García et al., 2018). Los valores de diversidad genética encontrados para *Caiman crocodilus* tanto en este estudio como por otros autores fueron mucho mayores a los observados para *Alligator mississippiensis* en USA por Glenn et al., (2002) (*h*= 0,153 en 1317 pb). Estos valores se han relacionado previamente con un alto mantenimiento de la diversidad genética por parte de *C. crocodilus,* a pesar de los eventos históricos que han reducido su tamaño poblacional, como la sobreexplotación, fragmentación de hábitat y expansión de la frontera agrícola (De la Ossa et al., 2013; Farias et al., 2004; Vasconcelos et al., 2006). Por el contrario, la baja diversidad genética encontrada en *A. mississippiensis*, ha sido atribuida a la severa reducción en tamaño poblacional que sufrió durante el Pleistoceno, con una subsecuente expansión demográfica en el Holoceno, mas no a la sobreexplotación comercial que también ha reducido significativamente los conteos poblacionales de la especie (Glenn et al., 2002; Vasconcelos et al., 2006).

En la Tabla 8 se ilustran los resultados de las pruebas de diferenciación poblacional mediante el estadístico *Fst* pareado (Hudson et al., 1992) (arriba de la diagonal) y la distancia en kilómetros entre las poblaciones (abajo de la diagonal). Estos resultados ponen en manifiesto la existencia de una diferenciación genética alta entre las poblaciones de Prado e Ibagué y muy alta entre las poblaciones de San Luis/Ibagué y San Luis/Prado con base en los criterios de Wright (1978) quien definió los valores de diferenciación genética *Fst* en bajos (<0.05), moderados (0.05-0.15), altos (0.15-0.25) y muy altos (Fst>0.25). Llama la atención que contrario a lo esperado, las poblaciones de Prado e Ibagué, que son las más distantes geográficamente, muestran una diferenciación significativamente menor a la que se encontró entre las demás poblaciones.

Tabla 8. Grado de diferenciación poblacional y distancia geográfica entre las poblaciones de *Caiman crocodilus fuscus* muestreadas en el Tolima.

Población	Ibagué	Prado	San Luis
Ibagué	---	0.21739*	0.57661*
Prado	75 Km	---	0.77551*
San Luis	30 Km	48 Km	---

*Valores estadísticamente significativos (*P*<0,05).

Ninguno de los valores de los tests de neutralidad obtuvo desviaciones estadísticamente significativas (P>0,10). Con estos análisis se puede distinguir entre poblaciones que podrían estar sometidas a un equilibrio mutación-deriva y poblaciones bajo un proceso no aleatorio, como selección, expansiones y contracciones demográficas, introgresión, entre otros, lo cual los hace útil para dilucidar la historia demográfica de una población (Depaulis & Veuille, 1998; Hartl & Clark, 1997; Simonsen et al., 1995). La prueba de significancia estadística que se realiza, evalúa si las diferencias encontradas entre los parámetros esperados en neutralidad son significativas o no y en base a esto se acepta o rechaza la hipótesis nula de equilibrio (Caiafa-Hernández, 2013; Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

Tabla 9. Tests de neutralidad evolutiva para las poblaciones de babilla del Tolima.

Población	***D*** ***Tajima***	***D*** ***Fu & Li***	***F*** ***Fu & Li***
Ibagué	1,43945	1,46255	1,58798
San Luis	-0,30187	-0,51900	-0,50749
Prado	-0,09908	-0,37037	-0,33669
Tolima	0,92899	0,20962	0,48737

Los análisis del test de neutralidad muestran que estas desviaciones no fueron estadísticamente significativas (*P*>0,10) por lo que los individuos que constituyen nuestra muestra habrían evolucionado en neutralidad o equilibrio mutación-deriva, tanto al

analizar cada una de las poblaciones por separado como al unir todas las muestras del Tolima (Tabla 9). Lo anterior concuerda con los datos de diversidad genética obtenidos, que sugieren una estabilidad de la población (Caiafa-Hernández, 2013). Este equilibrio ha sido reportado en otras poblaciones de la especie, como en las poblaciones amazónicas de *Caiman crocodilus crocodilus,* estudiadas por Vasconcelos et al., (2006) y de Farias et al., (2004), las cuales al ser analizadas por separado muestran un comportamiento de acuerdo a lo esperado bajo neutralidad. Sin embargo, cuando los autores analizaron la muestra como un todo, a lo que llamaron cuenca amazónica, encontraron leves indicios de una expansión demográfica respaldada por monitoreos poblacionales (Rebêlo & Lugli, 2001).

Con base en lo anterior, es posible que al analizar secuencias de un rango de distribución mucho mayor (*e.g.* al incluir las secuencias aún no publicadas de Jimenez-Alonso, (2016)) pueda obtenerse una mayor resolución para establecer si las poblaciones de *Caiman crocodilus fuscus* de Colombia, se encuentran en una expansión poblacional generalizada, lo que tendría relevancia en términos de manejo y conservación de la especie en el país. Estas señales de expansión demográfica serían compatibles con los datos históricos y evaluaciones poblacionales actuales para *Caiman crocodilus* (Balaguera-Reina & Velasco, 2019; De la Ossa et al., 2013; Vasconcelos et al., 2006). Esta especie parece haberse visto mucho menos afectada por la explotación que las otras especies de crocodylianos que habitan en su mismo rango de distribución, como *Crocodylus intermedius*, *C. acutus* y *Melanosuchus niger* que fueron severamente explotadas y disminuidas poblacionalmente hasta agotar su capacidad comercial en el siglo XX (Balaguera-Reina et al., 2018; Macgregor, 2006; Ponce-Campos, P., Thorbjarnarson & Velasco, 2012; Vasconcelos et al., 2006). Dada la falta de especialización ecológica de *Caiman crocodilus* y su mayor tasa reproductiva, esta especie pudo expandirse a los hábitats anteriormente ocupados por las especies de mayor interés comercial, lo que explicaría las desviaciones en los test de neutralidad (Grigg & Kirshner, 2015; Rueda-Almonacid et al., 2007; Vasconcelos et al., 2006).

4.3 RELACIONES GENEALÓGICAS INTRA E INTERPOBLACIONALES DE LA BABILLA EN EL TOLIMA

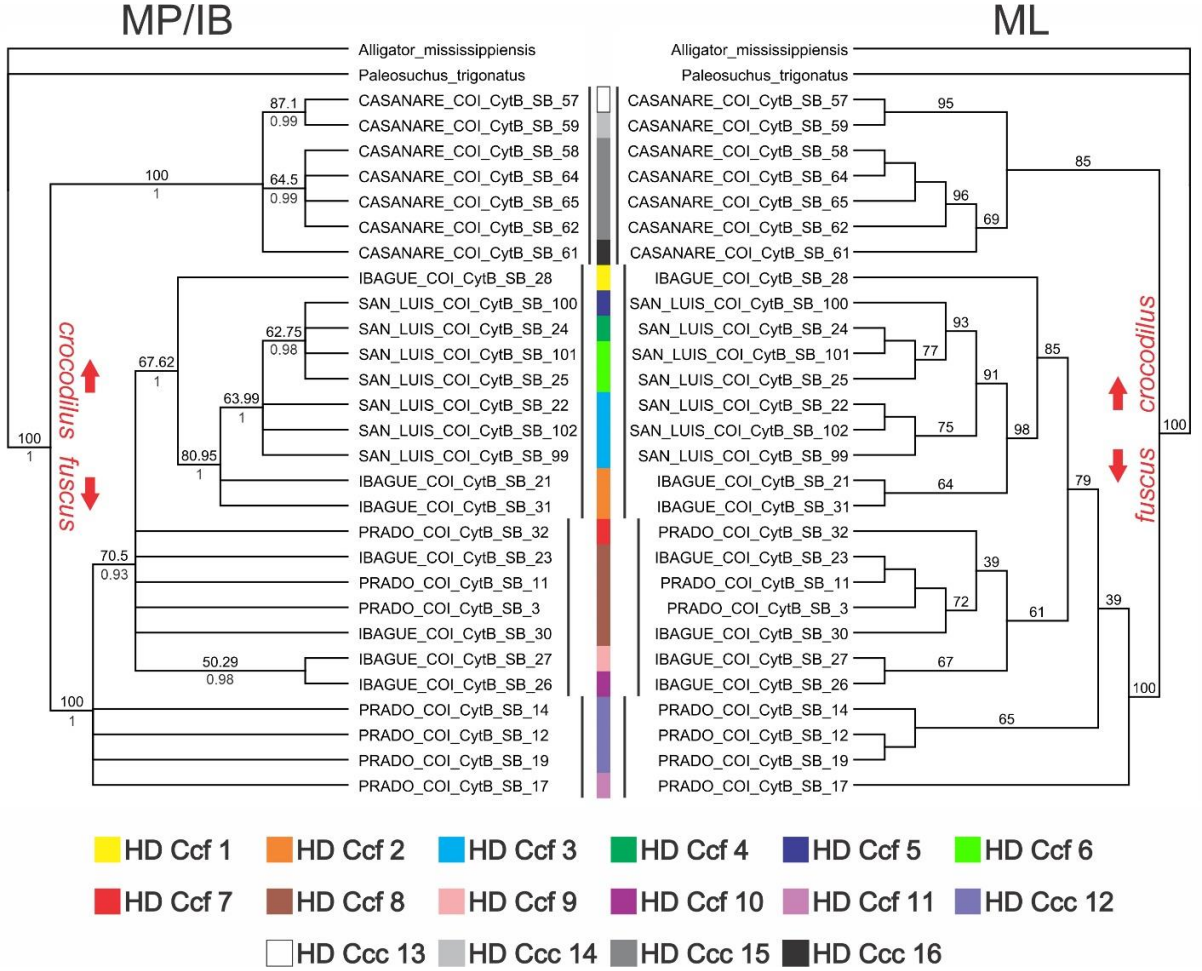
De acuerdo a los criterios de selección de modelos de sustitución, el modelo más apropiado para cada una de las posiciones codónicas del gen *COI* fue HKY (Hasegawa, Kishino, Yano), en cuanto al gen *CytB* en primera posición el modelo fue K80 +I (Kimura 80) y para la segunda y tercera posición el modelo HKY.

Dentro del Tolima, los árboles filogenéticos obtuvieron topologías similares, la reconstrucción basada en Inferencia Bayesiana (IB) fue igual a la basada en Máxima Parsimonia (MP); sin embargo, no logran resolver todos los clados como sí lo consiguió Máxima Verosimilitud (ML) (Figura 11). Esta filogenia reconoce como linajes separados a los individuos de ambas subespecies y dentro de estas, agrupa a las secuencias provenientes de las mismas poblaciones mostrando una diferenciación poblacional.

En las muestras del Tolima pueden distinguirse tres grupos de individuos con valores de soporte altos: el primero con muestras únicamente de la localidad de Prado, un segundo grupo con muestras tanto de Ibagué como de Prado y un tercero con secuencias de San Luis y de Ibagué. La presencia de estos agrupamientos concuerda con lo descrito en el inciso anterior, que evidenciaba altos niveles de diferenciación poblacional. De igual manera, esta agrupación tiene sentido si se considera que Ibagué y Prado comparten el haplotipo más frecuente.

Es importante mencionar que para inferencia bayesiana se aceptan valores de soporte por encima de 0.90 para cada rama y tanto para Máxima Parsimonia como para Máxima Verosimilitud, por sobre 60 por lo que la gran mayoría de las ramas tienen valores de soporte por sobre el valor de aceptación (Viloria-Lagares, 2017).

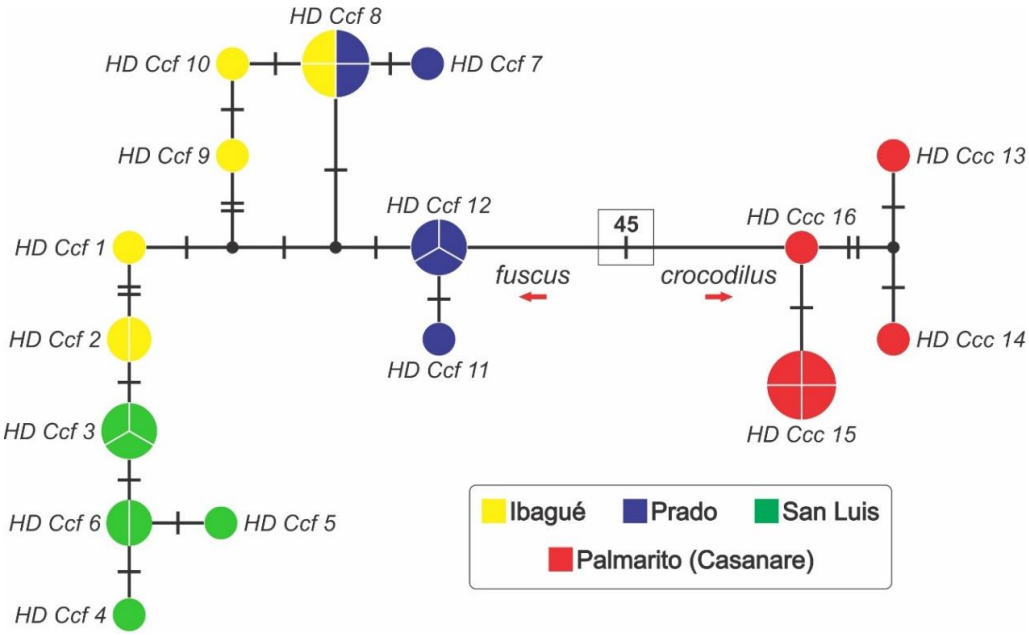
Figura 11. Relaciones filogenéticas de las poblaciones muestreadas mediante Inferencia Bayesiana, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud para *COI* y *CytB.*



Fuente: Autores

Para poder observar con una mayor claridad las relaciones entre los haplotipos encontrados se construyó la red de haplotipos (cuyos resultados están resumidos en la Figura 12), en la cual se observa el número de pasos mutacionales que generaron las diferencias entre cada uno de los haplotipos y entre ambas subespecies, así como la localidad de origen. Conforme a lo ilustrado en los árboles filogenéticos, San Luis cuenta con una integridad haplotípica mayor a la de las demás localidades, que comparten el haplotipo *HD Ccf 8*. Los haplotipos de Ibagué figuran en una posición intermedia en relación a las localidades del Tolima por lo que la asociación entre estos haplotipos no parece estar dada a su proximidad geográfica.

Figura 12. Redes de haplotipos de *Caiman crocodilus* de 3 localidades del Tolima y una del Casanare con los genes *COI* y *CytB* concatenados.



Fuente: Autores

Es un hecho que las poblaciones de Ibagué y Prado son más lejanas entre sí dentro de la muestra y que la represa de Prado representa una fuerte barrera física que, en la teoría, debería aislar a las poblaciones allí presentes. No obstante, el análisis haplotípico evidencia dos escenarios posibles: el haplotipo *HD Ccf 8* es compartido por estas poblaciones desde un tiempo anterior a la construcción de la represa o el ingreso/salida de este haplotipo ocurrió posterior a esta separación. El primer escenario implica la existencia de una conectividad espacial entre estas poblaciones que no está soportada por la alta estructura poblacional encontrada, sin embargo, los marcadores utilizados en este estudio podrían no ser los más apropiados para resolver esta incertidumbre. Empero, uno de los sustentos a esta hipótesis es el poco tiempo generacional que ha pasado desde la construcción de la represa (poco más de 60 años), tiempo muy reducido para observar una diferenciación genética marcada entre las dos poblaciones separadas por la represa. Respecto al segundo escenario, la movilidad implica que o bien la represa no es una barrera geográfica suficiente para aislar estas poblaciones o que la migración ocurrió por un evento diferente a la movilidad natural de la especie, como por translocación antropogénica. Dado que no se cuenta con la información geográfica ni

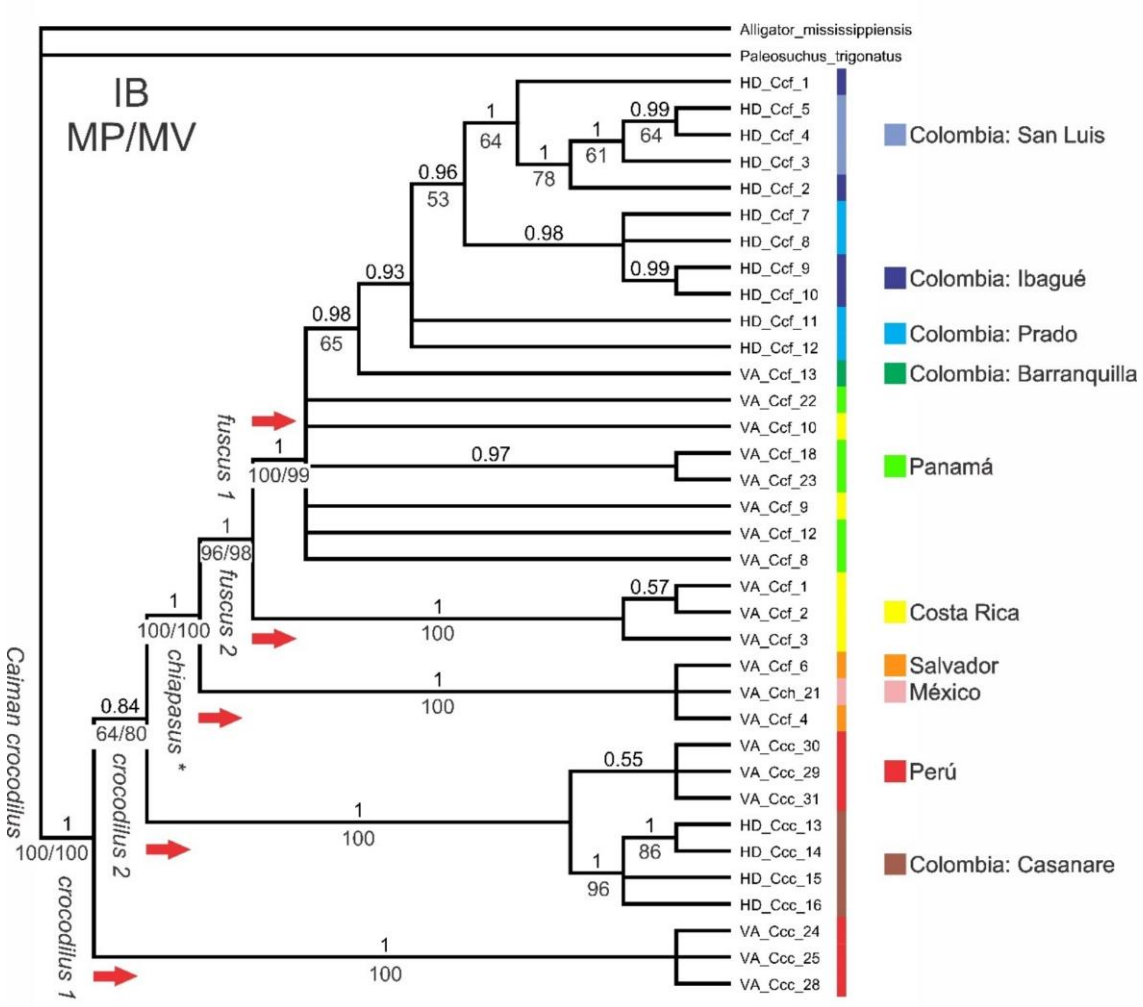
genética suficiente para llegar a este tipo de conclusiones, esta pregunta queda abierta para ser abordada en próximos estudios. Sin embargo, existe evidencia de que la translocación de estos animales, causada por el hombre, es un fenómeno constante. Múltiples reportes en la página web de CORTOLIMA muestran liberaciones de babillas en diferentes partes del departamento, a raíz de su ingreso al Centro de Atención de Fauna silvestre de la entidad y la valoración positiva de los animales para su liberación. Uno de los alcances de este proyecto fue evidenciar la presencia de una diferenciación poblacional y relaciones genealógicas dentro del departamento cuyos resultados deberían tenerse en cuenta a la hora de realizar este tipo de liberaciones y así conservar la integridad haplotípica presente en cada población. El uso de marcadores moleculares con más resolución poblacional como microsatélites, un mayor número de individuos en un rango de distribución más amplio en el alto Magdalena y un análisis basado en Sistemas de Información Geográfica, sería el siguiente paso para comprender los efectos de la represa sobre la estructura poblacional de la babilla en el departamento, identificar los posibles hábitat y rutas de migración que los individuos de la especie estarían empleando y en el caso de detectar una estructura alta, como la reportada en este estudio, establecer medidas de manejo para las liberaciones pos-decomiso o pos-rescate de la especie (Bowlby, Fleming, & Gibson, 2016; Werth, Schödl, & Scheidegger, 2014).

Los haplotipos provenientes del Casanare distan en 45 pasos mutacionales de los del Tolima, sin embargo, a pesar de que estas sean las poblaciones más cercanas entre ambas subespecies de las que se cuenta con secuencias, otros autores han hipotetizado que la distribución actual de las poblaciones de la especie, podría ser explicada no solo por la separación que generó el levantamiento de la cordillera oriental sino por otros eventos que extinguirían las poblaciones ancestrales de Colombia transandina, incluyendo las del Tolima, para un posterior proceso de repoblamiento desde Centroamérica (Jimenez-Alonso, 2016; Venegas-Anaya et al., 2008). De ser así, al aumentar la resolución e incluir las muestras disponibles en el GenBank, se encontraría una mayor relación entre las poblaciones de *C. crocodilus fuscus* de Centroamérica y las de *C. crocodilus crocodilus* de Casanare y Perú que entre las del Tolima y Casanare.

4.4 RELACIONES FILOGEOGRÁFICAS DE LAS POBLACIONES DE BABILLA DEL TOLIMA

Al analizar las secuencias obtenidas del GenBank en conjunto con las que fueron producto de este estudio, se lograron establecer las relaciones filogenéticas entre tres de las cuatro subespecies de *Caiman crocodilus* complementando lo realizado por otros autores. La topología resultante del algoritmo de Inferencia Bayesiana (IB) fue casi idéntica al de Máxima Parsimonia (MP), salvo pocas relaciones no resueltas por este último. En la Figura 13, se ilustran los valores de soporte en cada rama como: IB/MP en valores de probabilidad (arriba) y porcentaje (abajo), respectivamente. A pesar de que a nivel poblacional no se lograran resolver algunos clados, si se logra identificar 5 linajes independientes en la especie, que concuerda con lo encontrado por los autores que generaron las secuencias disponibles en el GenBank (Venegas-Anaya et al., 2008). En este trabajo se hará referencia a dichos linajes como se ilustra en la Figura 14. Los haplotipos del Tolima se encuentran dentro del Linaje *fuscus 1*, que agrupa haplotipos del Caribe colombiano, Panamá y Costa Rica, mientras que los haplotipos del Casanare se agrupan en el linaje *crocodilus 2* junto con algunos haplotipos del Perú. La topología de los árboles fue similar a la reportada por Jimenez-Alonso (2016), se encontró que dentro de la especie, el primer clado en separarse es el correspondiente al Linaje *crocodilus 1* (Perú), la segunda divergencia separa al linaje *crocodilus 2* (Perú y Casanare) del grupo que une los linajes *chiapasius* (México y Salvador) y los dos linajes de *fuscus.* El linaje *chiapasius* se muestra con un asterisco en el árbol debido a que agrupa individuos morfológicamente identificados como *C. crocodilus chiapasius* y *C. crocodilus fuscus* cuyas relaciones no fueron resueltas (Venegas-Anaya et al., 2008). El linaje *fuscus 2* corresponde a individuos del norte de Costa Rica y *fuscus 1* a los del sur de Costa Rica y Panamá, Caribe Colombiano y Tolima, siendo estos últimos la última divergencia dentro de la muestra. Cada una de las divergencias entre los distintos linajes encontrados presenta valores de soporte cercanos al 100% con las metodologías empleadas siendo el más bajo de 0.84 en IB y 64% en MP, correspondiente a la segunda separación de linajes.

Figura 13. Filogenia reconstruida mediante IB, MP y MV de las secuencias concatenadas de los genes *COI* y *CytB* disponibles para *Caiman crocodilus.*

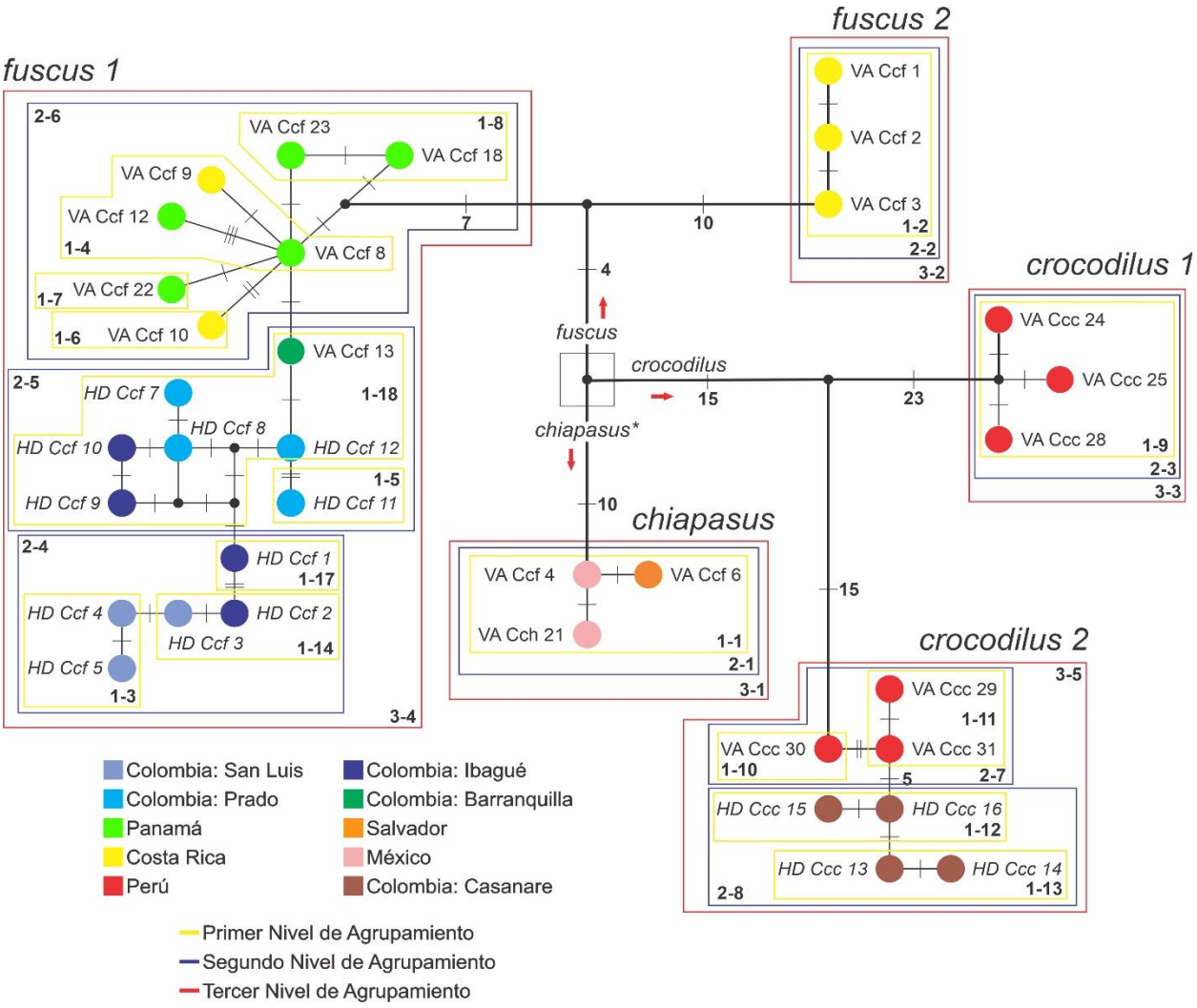


VA: Venegas-Anaya et al., (2008), HD: Autores.

Fuente: Autores

Como complemento a lo anterior, la red de haplotipos construida con un representante por haplotipo identificado tanto en este estudio como por Venegas-Anaya et al., (2008) encontró que el linaje que agrupa a los individuos del Tolima, Barranquilla, Panamá y Sur de Costa Rica, dista en 17 pasos mutacionales del linaje que agrupa los haplotipos del Norte de Costa Rica, 21 del linaje de los haplotipos de México y Salvador, 41 del grupo de animales de Casanare y Perú y finalmente 49 del linaje ubicado en la posición más ancestral de la filogenia reconstruida por lo que se conservan en la red, las relaciones establecidas en los árboles.

Figura 14. Redes de haplotipos y agrupamiento de haplotipos de los genes *COI* y *CytB* disponibles para *Caiman crocodilus* mediante TCS.



Fuente: Autores

En el Análisis de Clados Anidados (Templeton, 1998), se recuperan como haplogrupos o Unidades Evolutivamente Significativas los 5 linajes observados en los árboles (Figura 14). Los haplogrupos son definidos por cada tercer nivel de agrupamiento en el análisis, sin embargo, dentro de cada uno de ellos se observa cierta estructura dada por los segundos y primeros niveles de agrupamiento, especialmente en las muestras del Tolima, donde los haplotipos de Prado e Ibagué de agrupan con el de Barranquilla y por otra parte los haplotipos de San Luis se agrupan con los restantes de Ibagué. Dentro de este mismo linaje existe otro agrupamiento de segundo nivel que relaciona a los

haplotipos del sur de Costa Rica y de Panamá bajo un mismo grupo. Respecto a los haplotipos del Casanare, aunque pertenezcan al mismo haplogrupo que los haplotipos VA Ccc 29, 30 y 31 de la Amazonía peruana, al bajar al segundo nivel, se encuentran separados de estos a raíz de los 5 pasos mutacionales que los diferencian. Los demás haplogrupos no cuentan con estructura interna alguna en su interior y los tres niveles albergan los mismos haplotipos. El análisis muestra que las asociaciones geográficas dentro del clado 3-4 (linaje *fuscus 1*) podrían ser explicadas por un flujo génico ancestral seguido por la extinción de las poblaciones intermedias o por una dispersión restringida de genes, pero con cierta dispersión a larga distancia en áreas intermedias no ocupadas por la especie. Sin embargo, la inferencia muestra que son muy pocos clados dentro del haplogrupo como para discriminar entre una expansión de rango de distribución, colonización con dispersión restringida o flujo génico. Adicionalmente, la clave de inferencia indica que las relaciones geográficas dentro del clado 3-5 (linaje *crocodilus 2*) son explicadas consistentemente por fragmentación alopátrica. En lo que respecta a los demás clados, la hipótesis nula que indica que no hay relación entre las distancias genéticas y las geográficas no pudo ser rechazada, pero esto pudo deberse al bajo número de clados y de haplotipos por linaje. En la tabla 10 se resumen los resultados del Análisis de Clados Anidados y la respectiva inferencia.

Tabla 10. Inferencias demográficas del Análisis de Clados Anidados.

Clado	Cadena de Inferencia	Patrón Inferido
1-1, 1-4, 1-14, 1-18, 2-4, 2-5, 2-6	1-No	La hipótesis nula de no asociación geográfica de haplotipos no puede ser rechazada
3-4	1-2-3-5-6*-7-8 YES	Flujo restringido de genes, pero con cierta dispersión a larga distancia en áreas intermedias no ocupadas por la especie; o flujo de genes en el pasado seguido de la extinción de poblaciones intermedias. Insuficiente resolución para discriminar entre extensión de rango / colonización y dispersión restringida / flujo de genes
3-5	1-19 NO	Fragmentación alopátrica
Total	1-2 IO	Estado Indeterminado

Nuestros resultados concuerdan con las relaciones filogenéticas reportadas por Jimenez-Alonso, (2016) y Venegas-Anaya et al., (2008), soportando la existencia de 5 clados dentro de *Caiman crocodilus*. Adicionalmente se logró identificar que las secuencias provenientes del Tolima se agrupan junto al haplogrupo más grande, que abarca desde el sur de Costa Rica hasta las faldas de la vertiente occidental de la cordillera oriental. La red de haplotipos realizada con las secuencias disponibles en el GenBank más las del Tolima y las del Casanare, obtuvo una topología que sugiere una mayor relación entre los animales del norte de Mesoamérica con las del sur occidente de Sudamérica (separados por más de 3000 Km) y por consiguiente una mayor distancia genética entre las secuencias que están más cercanas geográficamente (300 km aprox.). Es decir, los animales más distantes entre sí en términos genéticos, basado en lo encontrado en este estudio, son los de Tolima y Casanare.

Venegas-Anaya et al., (2008) en su trabajo mencionan dos posibles hipótesis sobre la distribución geográfica de los *Caiman crocodilus* actuales. La primera sugiere una separación basal entre subespecies causada por el levantamiento de los andes, posterior colonización a Mesoamérica con el cierre del Istmo de Panamá. La segunda explicaría la divergencia entre subespecies a raíz de las incursiones marinas en lo que hoy se conoce como río Orinoco. Al estimar los tiempos de divergencia de los clados, observaron una correlación entre la divergencia basal entre subespecies y la orogénesis de los andes sudamericanos, por lo que sus resultados apoyan la primera hipótesis. Para que el segundo supuesto pudiese ponerse en consideración, las secuencias de Colombia Cisandina (en este caso, Casanare), tendrían que estar más relacionadas con el clado mesoamericano que con las secuencias del Perú, lo cual no ocurrió en nuestro análisis. Jimenez-Alonso, (2016), por su parte muestra que una posible explicación a la actual distribución de la especie parte de un origen amazónico, seguido de una separación causada por el levantamiento de los andes hace 5,7 - 6,7 millones de años que aislaría a lo que hoy se conoce como *Caiman crocodilus crocodilus* del resto de las poblaciones, en este caso, los ancestros de *Caiman crocodilus chiapasius* y de *Caiman crocodilus fuscus*. Con el cierre del istmo de panamá hace 3,0 a 3,5 millones de años, se produjo el intercambio biótico entre Sur y Centro América que permitiría la expansión de estos

animales hasta México. En este punto, la evidencia parece indicar que se produjo una extinción de los animales que permanecieron en la Colombia transandina tras el levantamiento de los andes, posiblemente atribuible a las incursiones marinas al norte del continente. *Caiman crocodilus* tiene una reconocida baja tolerancia a la salinidad, por lo que los ecosistemas acuáticos de agua salada generados por estas, pudo causar la extinción local. Al terminar estas incursiones y producirse una transformación en el paisaje colombiano que permitiera recuperar su habitabilidad por parte de la especie, habría una recolonización desde Mesoamérica que daría origen a las poblaciones que constituyen la muestra del autor y las del Tolima en este estudio. En ese escenario se esperaría una gran distancia genética entre las muestras del Tolima y las del Casanare, por lo que nuestros resultados aportan una evidencia importante a esta hipótesis.

El Análisis de Clados Anidados muestra resultados similares a los de los árboles filogenéticos, ya que separa los mismos 5 linajes y además logra establecer una inferencia sobre la cladogénesis del linaje que agrupa las muestras desde el sur de Costa Rica hasta el Tolima, así como de las relaciones dentro del clado que agrupa a Casanare con Perú. Sobre los demás clados no fue posible establecer una inferencia posiblemente por el bajo número de haplotipos e individuos representando a cada uno de los demás clados. Aumentar el muestreo a lo largo de la distribución geográfica de la especie, como en los llanos colombianos y venezolanos para el caso de *C. c. crocodilus*, en México y salvador para el caso de *C. c. chiapasius*, incluir las muestras de Jimenez-Alonso, (2016) en un análisis holístico y finalmente adquirir secuencias de *C. c. apaporiensis* en la amazonia Colombiana, sería ideal para establecer de manera más concreta una hipótesis sobre la historia evolutiva de *Caiman crocodilus*, identificar las unidades evolutivamente significativas y establecer recomendaciones de manejo a lo largo de su distribución.

4.5 RECOMENDACIONES E IMPLICACIONES PARA EL MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE EN EL DEPARTAMENTO

Este trabajo constituye el primer paso para dar cumplimiento a la estrategia de liberación de los individuos provenientes de zoocría en el Tolima propuesta en el Decreto 1608 de 1978. La alta variabilidad, neutralidad evolutiva y estructura poblacional encontrada, permiten establecer una especie de mapa de la distribución de diversidad genética en el Tolima, necesaria para definir zonas de liberación o translocación de individuos de zoocriadero, decomisos o rescates de los cuales se conozca su origen. Sería idóneo realizar un estudio con estos mismos marcadores en el zoocriadero Curazao, el único del alto magdalena, para identificar si dichos animales pertenecen a los mismos linajes que los reportados por este estudio y facilitar el inicio del programa de repoblamiento.

Como complemento a lo anterior, el uso de marcadores genéticos de mayor poder como los microsatélites, permitirían establecer con mayor discreción, la conectividad que exista dentro de las poblaciones del departamento y consigo la necesidad de definir o no regiones específicas de liberación para los animales producto de la cuota de repoblación. Al acoplar este análisis con el uso de sistemas de información geográfica, podrían establecerse además efectos del paisaje sobre la diversidad genética de las poblaciones de babilla que expliquen la estructura encontrada, especialmente en la represa de Prado.

De manera similar, a raíz de la diferenciación poblacional encontrada, se recomienda a entidades que ejercen control y vigilancia ambiental en el departamento como CORTOLIMA, planificar las liberaciones de individuos de esta especie en áreas protegidas circundantes al lugar de origen del animal, para evitar translocaciones que alteren la integridad haplotípica encontrada.

4.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Parte importante del ejercicio de la ciencia es la identificación de los aspectos que limitan las inferencias producto de una investigación. El alcance de los resultados de este proyecto, se ve influenciado en primera instancia por el tamaño muestreal de cada población, así como por el número de localidades en donde se realizaron las colectas. A pesar de que se buscó abarcar la mayor área posible del Valle del Alto Magdalena en el Tolima, algunas eventualidades impidieron el muestreo en zonas importantes del departamento, como las cuencas de los ríos Saldaña y Magdalena e impidieron la consecución de un mayor número de individuos por población, algo esencial para la formulación de inferencias demográficas robustas.

Otro aspecto que limita las aseveraciones a realizar acerca de las poblaciones estudiadas, consiste en los marcadores genéticos utilizados, cuya resolución a una escala poblacional es baja, de manera que aspectos claves de la genética poblacional, como el flujo génico, la detección de presiones selectivas, estructura poblacional, cuellos de botella, etc., no logran determinarse. Así mismo la longitud de las secuencias obtenidas poseen una influencia importante en la robustez de nuestros análisis, al no corresponder a genes completos.

A la hora de interpretar los resultados y conclusiones aquí presentadas deben tomarse en consideración las anteriores limitaciones, en vista de que la resolución de las inferencias de este tipo de trabajos suele afectarse justamente por aspectos como el *n* muestreal, el área muestreada y la longitud de las secuencias obtenidas.

5. CONCLUSIONES

Se encontraron valores de diversidad haplotípica y nucleotídica altos en el departamento del Tolima, así como un alto número de haplotipos cuya representatividad está soportada por una curva de acumulación con un alto porcentaje de cobertura.

No se encontró evidencia de procesos demográficos que impliquen eventos de expansión o disminución poblacional dentro de las poblaciones de babilla del Tolima.

La evidencia muestra la existencia de una alta diferenciación poblacional dentro del Tolima, con presencia de haplotipos únicos para cada una de las poblaciones y encontrando solo un haplotipo compartido por dos poblaciones (Prado e Ibagué).

Contrario a lo esperado, al tener en cuenta la distancia geográfica, la población de Ibagué se encontró en una posición intermedia a las de San Luis y Prado en términos de relaciones genealógicas. La ampliación del tamaño muestreal y área de muestreo, el uso de nuevos marcadores moleculares y la aplicación de sistemas de información geográfica, permitirían incrementar la comprensión de la estructura poblacional dentro del departamento.

Las poblaciones de *Caiman crocodilus fuscus* presentes en el Tolima están más relacionadas con las poblaciones de *Caiman crocodilus fuscus* del Sur de Costa Rica y Panamá que con las poblaciones de *Caiman crocodilus crocodilus del Casanare.* Así mismo, estas últimas se encuentran relacionadas con las poblaciones de la Amazonía peruana.

Se encontró evidencia que soporta la hipótesis de una extinción de los linajes que ocupaban el territorio transandino de Colombia previo a las incursiones marinas del norte de Sudamérica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera-Miller, E. F. (2011). *Análisis Filogeográfico de Chaetodipus siccus de la Cuenca de Los Planes, B. C. S.* Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C.

Aguirre-Planter, E. (2007). Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. In L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 49–61). Mexico City: Instituto Nacional de Ecología.

Allendorf, F. W., Luikart, G., & Aitken, S. (2013). *Conservation and the Genetics of Populations* (2nd ed.). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Ardila-Robayo, M. C., Moreno-Arias, R. A., Zúñiga, H., Martinez-Barreto, W., & Suarez-Daza, R. M. (2009). *Formulación del Plan de Conservación de la Especie Babilla Caiman crocodilus fuscus en Jusrisdicción de la Corportación Autónoma Regional de Cundinamarca*. EBTRF Villavicencio.

Arenas-Calle, W. C., & García-Merchán, V. H. (2011). Estadística filogeográfica Culex annulirostris : Construcción de redes de haplotipos en estudios de genealogías intraespecíficas, usando tres metodologías diferentes. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias BIológicas*, *23*(1), 31–41.

Balaguera-Reina, S. A. (2017). ICroc.

Balaguera-Reina, S. A., Barbosa-Cabanzo, J., Moná-Sanabria, Y., Farias-Cutidor, N., Caicedo-Herrera, D., Martínez-Palacios, R., & González-Maya, J. F. (2010). Estado poblacional de Caiman crocodilus en la cuenca baja y media del río Atrato, Departamento de Chocó, Colombia. *Revista Latinoamericana de Conservación*, *1*(2), 131–135.

Balaguera-Reina, S. A., & Densmore, L. D. (2014). Legislation and conservation efforts concerning crocodiles in Colombia: A historical review. *Herpetological Review*, *45*(4), 638–642.

Balaguera-Reina, S. A., Espinosa-Blanco, A., Antelo, R., Morales-Betancourt, M., & Seijas, A. (2018). Crocodylus intermedius. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Balaguera-Reina, S. A., & González-Maya, J. F. (2009). Estructura poblacional, abundancia, distribución y uso de hábitat de Caiman crocodilus fuscus (Cope, 1868) en la Vía Parque Isla de Salamanca, Caribe colombiano. *Revista de Biologia Marina y Oceanografia*, *44*(1), 145–152.

Balaguera-Reina, S. A., Prieto, J., Farfán-Ardila, N., Vides, A., & Carvajal-Bonilla, L. (2019). *Conservando el caimán aguja: Plan para su conservación, manejo y uso sostenible en el sector nororiental del departamento del Magdalena*. Ibagué - Tolima: Universidad de Ibagué.

Balaguera-Reina, S. A., & Velasco, A. (2019). Caiman crocodilus. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Barahona, S. L., Bonilla, O. P., Martinez, A., & Naranjo, H. (2000). *Estado y distribución de los Crocodylia en Colombia: compilación de resultados del Censo Nacional, 1994 a 1997*. Bogotá, Colombia: Ministerio del Medio Ambiente de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (Colombia).

Bezuijen, M. R., Shwedick, B., Simpson, B., Staniewicz, A., & Stuebing, R. (2014). Tomistoma schlegelii. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Bezuijen, M. R., Simpson, B., Behler, N., Daltry, J., & Tempsiripong, Y. (2012). Crocodylus siamensis. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Bloor, P., Ibáñez, C., & Viloria-Lagares, T. A. (2015). Mitochondrial DNA analysis reveals hidden genetic diversity in captive populations of the threatened American crocodile (Crocodylus acutus) in Colombia. *Ecology and Evolution*, *5*(1), 130–140.

Bocourt, F. (1876). Note sur quelques reptiles de l'Isthme de Tehuantepec (Mexique) donnés par M. Sumichrast au museum. *Journal de Zoologie*, *5*(5–6), 386–411.

Bowlby, H. D., Fleming, I. A., & Gibson, A. J. F. (2016). Applying landscape genetics to evaluate threats affecting endangered Atlantic salmon populations. *Conservation Genetics*, *17*(4), 823–838.

Caiafa-Hernández, I. I. (2013). *Estructura genética del Jurel Caranx hippos (Pisces: Carangidae) en el Caribe Colombiano*. Universidad Nacional de Colombia sede Caribe.

Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. E. (2013).

Diferencias genéticas entre poblaciones de Aedes aegypti de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomedica*, *33*(1), 89–98.

Castellanos-Labarcena, J., & Milián-García, Y. (2017). Caracteres genéticos y morfológicos dentro de Crocodylia : contexto de los estudios de sistemática molecular de Crocodylus de Cuba. *Revista Cubana De Ciencias Biológicas*, *5*(3), 1–11.

Chiappe, L. M. (1988). Un nuevo Caiman (Crocodylia, Alligatoridae) de la Formación Tremembé (Oligoceno), Estado de Sao Paulo, Brasil, y su significado paleoclimático. *Paula-Coutiana*, *3*(3), 49–66.

Choudhury, B. C., & de Silva, A. (2013). Crocodylus palustris. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, *9*(1), 1657–1659.

Colwell, R. K. (2014). *EstimateS 9.1. 0. Statistical estimation of species richness and shared species form samples*.

Cook-Patton, S., McArt, S., Parachnowitsch, A., Thaler, J., & Agrawal, A. (2011). A direct comparison of the consequences of plant genotypic andspecies diversity on communities and ecosystem function. *Ecology*, *92*(4), 915–923.

Cope, E. D. (1868). On the Crocodilian Genus Perosuchus. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, *20*, 242–300.

Cornejo Romero, A., Serrato Díaz, A., Rendón Aguilar, B., & Rocha Munive, M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Ciudad de México - México: SEMARNAT, INECC,UAM-I.

CORTOLIMA. (2015). *Plan de Manejo Ambiental (PMA) Humedal Rio Viejo*. Ibagué - Tolima.

CORTOLIMA, CORPOICA, & Universidad del Tolima. (2010). *Identificación, caracterización, zonificación y plan de manejo del complejo de humedales naturales en el Valle Cálido del Magdalena- Departamento del Tolima - Informe Técnico Final*. Ibagué - Tolima.

Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology. Vol. 1*, 159–187.

Crocodile Specialist Group. (1996). Osteolaemus tetraspis. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772.

Daugherty, C. H., Cree, A., Hay, J. M., & Thompson, M. B. (1990). Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (Sphenodon). *Nature*, *347*(1), 177–179.

De la Ossa, J., De la Ossa-Lacayo, A., Fajardo-Patiño, A., Lasso, C. A., Antelo, R., & Morales-Betancourt, M. A. (2013). Caiman crocodilus. In M. A. Morales-Betancourt, C. A. Lasso, J. De la Ossa, & A. Fajardo-Patiño (Eds.), *Biología y conservación de los Crocodylia de Colombia*. Bogotá, Colombia: Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

Densmore, L. D., & Owen, R. D. (1989). Molecular systematics of the order crocodilia. *Integrative and Comparative Biology*, *29*(3), 831–841.

Depaulis, F., & Veuille, M. (1998). Neutrality tests based on the distribution of haplotypes under an infinite-site model. *Molecular Biology and Evolution*, *15*(12), 1788–1790.

DeSalle, R., & Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, *5*(9), 702–712.

Domínguez-Domínguez, O., & Vázquez-Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, *32*(1), 59–70.

Duméril, A. M. C., & Bibron, G. (1836). *Erpetologie Générale ou Histoire Naturelle Complete des Reptiles* (3rd ed.). Paris: Libr. Encyclopédique Roret.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564–567.

Farias, I. P., Silveira, R. Da, de Thoisy, B., Monjeló, L. A., Thorbjarnarson, J., & Hrbek, T. (2004). Genetic diversity and population structure of amazonian crocodilians.

Animal Conservation, *7*(1), 265–272.

Frankham, R. (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, *143*(9), 1919–1927.

Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, *133*(3), 693–709.

Glenn, T. C., Staton, J. L., Vu, A. T., Davis, L. M., Alvarado-Bremer, J. R., Rhodes, W. E., … Sawyer, R. H. (2002). Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in crocodilians. *Journal of Experimental Zoology*, *294*(4), 312–324.

Godshalk, R. (2006). *Phylogeography and conservation genetics of the yacare caiman (Caiman yacare) of South America*. University of Florida.

Grigg, G. C., & Kirshner, D. (2015). *Biology and Evolution of Crocodylians*. Clayton South, Australia: CSIRO Publishing.

Guevara, G., Lozano, P., Reinoso, G., & Villa, F. (2009). Horizontal and seasonal patterns of tropical zooplankton from the eutrophic Prado Reservoir (Colombia). *Limnologica*, *39*(2), 128–139.

Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1997). *Principles of Population Genetics* (3rd ed.). Canada: Sinauer Associates, INC., Publishers.

Hiesinger, M., Lôffert, D., Ritt, C., & Oelmûller, U. (2001). The effects of phenol on nucleic acid preparation and downstream applications. *QUIAGEN News*, *5*(1), 23–26.

Horiike, T. (2016). An Introduction To Molecular Phylogenetic Analysis. *Reviews in Agricultural Science*, *4*(1), 36–45.

Hudson, R R, Slatkin, M., & Maddison, W. P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, *132*(2), 583–589.

Hudson, Richard R. (2000). A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*, *155*(4), 2011–2014.

Iijima, M., & Kubo, T. (2019). Allometric growth of limb and body proportions in crocodylians. *Journal of Zoology*, *309*(3), 200–211.

iNaturalist. (2019). iNaturalist.

INVECOR, & CGI. (2007). *Cuaderno de Información de la Central Hidroeléctrica de*

Prado. Electrolima S.A.

Jakobsson, M., Edge, M. D., & Rosenberg, N. A. (2013). The relationship between FST and the frequency of the most frequent allele. *Genetics*, *193*(2), 515–528.

Jiang, H., & Wu, X. (2018). Alligator sinensis. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Jimenez-Alonso, G. (2016). *Análisis filogenético de Caiman crocodylus (Cope, 1868) en la costa atlantica y pacifica colombiana empleando marcadores de ADN mitocondrial*. Universidad Nacional de Colombia.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., … Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647–1649.

Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.

Laikre, L., Jansson, E., Wennerström, L., Lundmark, C., Sandström, A., & Edman, M. (2016). Lack of recognition of genetic biodiversity: International policy and its implementation in Baltic Sea marine protected areas. *Ambio*, *45*(6), 661–680.

Lang, J., Chowfin, S., & Ross, J. P. (2019). Gavialis gangeticus. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Lapbenjakul, S., Thapana, W., Twilprawat, P., Muangmai, N., Kanchanaketu, T., Temsiripong, Y., … Srikulnath, K. (2017). High genetic diversity and demographic history of captive Siamese and Saltwater crocodiles suggest the first step toward the establishment of a breeding and reintroduction program in Thailand. *PLoS ONE*, *12*(9), 1–21.

Larriera, A., Webb, G., Velasco, A., Rodriguez, M., & Ortiz, B. (2004). *Mission to Colombia*. Bogotá, Colombia: IUCN-SSC CROCODILE SPECIALIST GROUP.

Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, *6*(9).

Linnaeus, C. von. (1758). *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* (10th ed.). Estocolmo, Suecia: Laurentii Salvii.

López Cruz, M. E. (2018). *Aislamiento e identificación de Salmonella spp., de babillas (Caiman crocodilus fuscus) en su hábitat natural (Represa Hidroprado), Departamento del Tolima*. Universidad del Tolima.

Lowenstein, J. M. (1986). Molecular phylogenetics. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences. Vol. 14*, *14*(1), 71–83.

Macgregor, J. (2006). *The Call of the Wild: Captive Crocodilian Production and the Shaping of Conservation Incentives*. Cambridge, UK.: TRAFFIC International.

McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2016). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In *Molecular Diagnostics: Third Edition*. Elsevier Ltd.

Medem, F. (1955). A new subspecies of Caiman sclerops from Colombia. *Fieldiana: Zoology*, *37*(11), 339–343.

Medem, F. (1981). *Los Crocodylia del Sur de América*. Bogotá, Colombia: Colciencias.

Milián-García, Y., Russello, M. A., Castellanos-Labarcena, J., Cichon, M., Kumar, V., Espinosa, G., … Janke, A. (2018). Genetic evidence supports a distinct lineage of American crocodile (Crocodylus acutus) in the Greater Antilles. *PeerJ*, *6*, 1–16.

Mook, C. (1934). The Evolution and Classification of the Crocodilia. *The Journal of Geology*, *42*(3), 295–304.

Mora-Rivera, C. (n.d.). *Estado poblacional, distribución y evaluación de hábitat para el establecimiento de perspectivas de manejo de la babilla (Caiman crocodilus fuscus) en la represa hidroeléctrica del río Prado en el departamento del Tolima*. Universidad del Tolima.

Morales-Betancourt, M. A., Fajardo-Patiño, A., Lasso, C. A., & De la Ossa, J. (2013). Los Crocodylia de Colombia: generalidades y estado de conservación. In M. Morales-Betancourt, C. Lasso, J. De La Ossa, & A. Fajardo-Patiño (Eds.), *Biología y conservación de los Crocodylia de Colombia*. Bogotá: Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

Morales-Betancourt, M., Lasso, C., De La Ossa, J., & Fajardo-Patiño, A. (2013). *Biología y conservación de los Crocodylia de Colombia.* (Vol. 1; V. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia, Ed.). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt,.

Moreno-Arias, R. A., Ardila-Robayo, M. C., Martínez-Barreto, W., & Suarez-Daza, R. M. (2013). Ecología poblacional de la babilla (Caiman crocodilus fuscus) en el valle del río Magdalena (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia*, *35*(1), 25–36.

Moreno-Bernal, J. W., Head, J., & Jaramillo, C. A. (2016). Fossil Crocodilians from the High Guajira Peninsula of Colombia: Neogene faunal change in northernmost South America. *Journal of Vertebrate Paleontology*, *36*(3), 1–17.

Moritz, C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, *51*(2), 238–254.

Palumbi, S. (1991). *Simple fool's guide to PCR*. Dept. of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii.

Panchal, M. (2006). The automation of Nested Clade Phylogeographic. *Bioinformatics*, *23*(4), 509–510.

Ponce-Campos, P., Thorbjarnarson, J., & Velasco, A. (2012). Crocodylus acutus. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Posada, D., Crandall, K., & Templeton, A. R. (2000). GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, *9*(1), 487–488.

Posada, David, & Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, *53*(5), 793–808.

Posso-Peláez, C. (2013). *Evaluación del estatus taxonómico del cocodrilo del orinoco Crocodylus intermedius (Graves, 1819) en Colombia mediante marcadores mitocondriales como herramienta para establecer estrategias de conservación de la especie*. Universidad Nacional de Colombia.

Primack, R. (2014). *Essentials of Conservation Biology* (Fitfh Edit). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, INC., Publishers.

Ramírez, E., & Grattz, C. (2012). Problemática Ambiental en la Represa de Prado-Tolima. *Ingenio Libre*, 82–85.

Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, *19*(12), 2092–2100.

Ramos Herrera, A. T. (2015). *Aplicación de redes de haplotipos para estudios genético*

espaciales del complejo de especes Lutzomya longipalpis (Dìptera: Phlebotomìnae), utilizando la region mitocondrial COI. Univerisadad Central de Venezuela.

Rebêlo, G. H., & Lugli, L. (2001). Distribution and abundance of four caiman species (Crocodylia: Alligatoridae) in Jaú National Park, Amazonas, Brazil. *Revista de Biología Tropical*, *49*(3–4), 1096–1109.

Reinoso Flórez, G., Villa, F., Losada, S., García Melo, J., & Vejarano, M. (2010). *Biodiversidad faunística de los humedales del departamento del Tolima*. Ibagué - Tolima: Grupo de Investigación en Zoología de la Universidad del Tolima.

Reinoso, G., Guevara, G., Vejarano, M., Garcia, J., & Villa, F. (2007). Evaluación del río Prado a partir de los macroinvertebrados y de la calidad del agua. *Revista de Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, *19*(1), 141–154.

Rocha, M., & Gasca, J. (2007). Ecología molecular de la conservación. In L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 251–278). Mexico City: Instituto Nacional de Ecología.

Rodríguez Mancera, N. J., & García Reyes, O. (2008). Comercio de Fauna Silvestre en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, *61*(2), 4618–4645.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., … Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542.

Ross, J. P. (1969). Why Save the Alligator? *International Crocodilian Society*. Florida.

Ross, J. P. (1998). *Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan.* (2nd ed.). Switzerland and Cambridge, UK: IUCN/SSC Crocodile Specialist Group.

Rozas, J. (2009). DNA Sequence Polymorphism Analysis Using DnaSP. In David Posada (Ed.), *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis* (pp. 337–350). Humana Press.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3299–3302.

Rueda-Almonacid, J. V, Carr, J. L., Mittermeier, R. a, Rodriguez-Mahecha, J. V, Mast,

R. B., Vogt, R. C., … Mittermeier, C. G. (2007). *Serie Guías Tropicales de Campo: 6. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del Trópico*. Bogotá, Colombia: Conservacíon Internacional.

Ryder, O. A. (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, *1*(1), 9–10.

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schneider, J. G. (1801). *Historiae Amphibiorum naturalis et literariae. Fasciculus secundus continens Crocodilos, Scincos, Chamaesauras, Boas, Pseudoboas, Elapes, Angues, Amphisbaenas et Caecilias*. Jena: F. J. Frommann.

Seijas, A. (2011). *Los Crocodylia de Venezuela*. Venezuela: Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Ecología y Conservación. Colección Estudios y Divulgación Científica y Tecnológica.

Shine, C., & de Klemm, C. (1999). *Wetlands, water and the law: using law to advance wetland conservation and wise use*. Cambridge: IUCN.

Shirley, M. H. (2014). Mecistops cataphractus. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Simonsen, K. L., Churchill, G. A., & Aquadro, C. F. (1995). Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*, *141*(1), 413–429.

Swofford, D. L. (2017). *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony*.

Tajima, F. (1984). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, *123*(1), 585–595.

Targarona, R. R., Soberón, R. R., Cotayo, L., Tabet, M. A., & Thorbjarnarson, J. (2008). Crocodylus rhombifer. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Templeton, A. R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, *7*(4), 381–397.

Templeton, A. R. (2004). Statistical phylogeography: Methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, *13*(4), 789–809.

Templeton, A. R., Hemmer, H., Mace, G., Seal, U. S., Shields, W. M., & Woodruff, D. S. (1986). Local adaptation, coadaptation, and population boundaries. *Zoo Biology*,

5(2), 115–125.

Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, *44*, W232–W235.

Ulloa-Delgado, G., & Cavanzo-Ulloa, D. (2003). *Conservación, manejo y uso sostenible de la babilla (Caiman crocodilus fuscus) en la bahía de Cispatá. Etapa I. Caracterización y Diagnóstico de las poblaciones de Caiman crocodilus fuscus y su hábitat natural*. Monteria.

Van Weerd, M., Pomaro, C., De Leon, C., Antolin, R., & Mercado, V. (2016). Crocodylus mindorensis. In *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*.

Vasconcelos, W. R., Hrbek, T., Da Silveira, R., de Thoisy, B., Marioni, B., & Farias, I. P. (2006). Population genetic analysis of Caiman crocodilus (Linnaeus, 1758) from South America. *Genetics and Molecular Biology*, *29*(2), 220–230.

Venegas-Anaya, M., Crawford, A. J., Escobedo Galván, A. H., Sanjur, O. I., Densmore, L. D., & Bermingham, E. (2008). Mitochondrial DNA phylogeography of Caiman crocodilus in MesoAmerica and South America. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *309*(A), 614–627.

Viloria-Lagares, T. A. (2017). *Filogeografía del cocodrilo aguja (Crocodylus acutus) en Colombia basado en secuencias de ADN mitocondrial*. Universidad Nacional de Colombia.

Viloria-Lagares, T. A., Bloor, P., & Moreno-Arias, R. A. (2017). Assessment of American crocodile, Crocodylus acutus (Crocodylidae), and Brown Caiman, Caiman crocodilus fuscus (Alligatoridae), populations in the Paramillo National Natural Park, Colombia. *Herpetological Conservation and Biology*, *12*(1), 24–32.

Waples, R. S. (1995). Evolutionarily Significant Units and the Conservation of Biological Diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium*, *17*(1), 8–27.

Webb, G., Manolis, C., & Jenkins, R. (2012). *Improving international systems for trade in reptile skins based on sustainable use*. Geneva: United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD).

Werth, S., Schödl, M., & Scheidegger, C. (2014). Dams and canyons disrupt gene flow

among populations of a threatened riparian plant. *Freshwater Biology*, *59*(12), 2502–2515.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, *15*(1), 323–354.

Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press.

Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 2 Código: GB-P04-F03 Versión: 04 Fecha Aprobación: 04/03/2019

Los autores:

Nombre Completo	Identificación N°
Carlos Felipe Hernández González	1110581229
Diana María Díaz Moreno	1110567054

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar [X]

No Autorizar [ ] **Motivo:** _____

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado [X]

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

USO OFICIAL

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 ***"...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable"*** y 37 ***"...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro"***. **El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, *"los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores"* y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.**

- Identificación del documento:

Título completo:	Caracterización genética de Caiman *crocodilus fuscus* en el departamento del Tolima mediante marcadores mitocondriales
Trabajo de grado presentado para optar al título de:	Biólogos

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el día 28 del mes de Julio del año 2019.

Nombre Completo	Firma	Identificación N°.
Carlos Felipe Hernandez Gonzalez		1110581229
Diana María Díaz Moreno		1110567054

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.

USO OFICIAL