



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Caracteres genéticos y morfológicos dentro de Crocodylia: contexto de los estudios de sistemática molecular de *Crocodylus* de Cuba

*Genetics and morphological characters in Crocodylia: the context of the molecular systematics studies of Cuban Crocodylus*

Jessica Castellanos-Labarcena<sup>1</sup> y Yoamel Milián-García<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

\* Autor para correspondencia:  
[yoamelmg@gmail.com](mailto:yoamelmg@gmail.com)

### RESUMEN

El entendimiento de la historia filogenética y biogeográfica del orden Crocodylia ha suscitado un amplio debate en los últimos 20 años. Diversos métodos de análisis, así como datos basados en la morfología, paleobiogeografía y marcadores moleculares han sido usados para el estudio de la sistemática de los crocodylianos. Sin embargo, ningún estudio hasta la fecha ha explicado completamente las relaciones evolutivas de estos considerando su distribución y ecología. Aunque de modo general han sido considerados un grupo antiguo, ampliamente distribuido y relativamente homogéneo, el panorama actual revela la existencia de una gran cantidad de especies crípticas dentro del orden. La existencia de un complejo escenario en el cual las relaciones entre especies a nivel del orden Crocodylia no han sido estables a lo largo del tiempo, el latente debate respecto al número de familias en el orden, así como la identificación de una diversidad mayor que la tradicionalmente considerada; constituye el contexto de los estudios de caracterización genética de los miembros del género *Crocodylus* que habitan en Cuba. De este modo, la presente revisión se propone como objetivos demostrar la evolución de la relaciones filogenéticas propuestas dentro del orden Crocodylia, a partir del empleo de diferentes caracteres moleculares y morfológicos, así como analizar la dinámica en las relaciones propuestas como marco contextual para los estudios de genética para la conservación y sistemática molecular del género *Crocodylus* en Cuba.

**Palabras clave:** *Crocodylus*, sistemática molecular, especies crípticas, orden Crocodylia, genética para la conservación

### ABSTRACT

*Over the last two decades, a large literature has amassed regarding the phylogenetic history and biogeography of the crown-group order Crocodylia. Crocodylian systematics has been discussed at higher-level relationships*

Recibido: 2017-02-19

Aceptado: 2017-04-08

*based on morphological, paleobiogeography, and molecular data. However, no study has completely explained crocodylian relationships with their distribution and ecology. Though crocodiles have generally been considered an ancient, wide-ranging, and relatively homogenous group, the current situation reveals the existence of highly divergent, cryptic crocodylian species in the order. The complex scene in which the relationships between species in the order Crocodylia haven't been stable in time, the underlying discussion about the number of family in the order and the fact that the true diversity within the order is not accurately represented by current taxonomy, represent the framework in the studies of the genetic characterization of the *Crocodylus* species inhabiting Cuba. In this way, the present review aims to demonstrate the evolution of the phylogenetic relationships proposed in the order Crocodylia, using different molecular and morphological characters and to analyze the dynamic in the proposed relationships as a contextual framework for the studies of conservation genetics and molecular systematic of the genus *Crocodylus* in Cuba.*

**Keywords:** *Crocodylus*, molecular systematics, cryptic species, order Crocodylia, conservation genetics

## INTRODUCCIÓN

Los crocodylianos están considerados entre los reptiles vivos, como los más grandes y prominentes del mundo. En la actualidad el orden Crocodylia está representado por tres familias: Gavialidae, Crocodylidae y Alligatoridae las cuales presentan historias evolutivas separadas desde hace aproximadamente 100 millones de años. Sin embargo, se considera que los representantes vivos de estos grupos poseen muy pocas diferencias en su anatomía, fisiología, ecología y etología (Grigg y Kirshner, 2015).

Hasta el año 2006, en el orden eran reconocidas 23 especies divididas en ocho géneros (McAliley *et al.*, 2006). Aunque los crocodylianos han sido considerados como un grupo relativamente homogéneo y antiguo, numerosos trabajos han mostrado patrones de considerable variación intraespecífica (Hekkala *et al.*, 2010, Meredith *et al.*, 2011, Milián-García *et al.*, 2015) y diversificación a nivel de especie (Eaton *et al.*, 2009, Hekkala *et al.*, 2011, Shirley *et al.*, 2014). Es por esto que, actualmente el orden está representado por 27 especies reconocidas o propuestas, distribuidas en nueve géneros. Sin embargo, la variabilidad observada es mayor y se plantea que cuando la taxonomía se resuelva completamente es posible que se reconozcan aproximadamente 30 especies (Grigg y Kirshner, 2015).

El entendimiento de la historia filogenética y biogeográfica en este orden ha suscitado un amplio debate en los últimos 20 años. Diversos métodos de análisis, así como datos basados en la morfología, paleobiogeografía y marcadores moleculares han sido usados para el estudio de la sistemática de los

crocodylianos, lo que ha dado lugar a una “evolución” de los cladogramas (Oaks, 2007). No obstante, ningún estudio hasta la fecha ha explicado completamente las relaciones evolutivas de estos considerando su distribución y ecología (Srikulnath *et al.*, 2015).

Inicialmente la mayoría de los estudios realizados estuvieron enfocados en resolver las discrepancias existentes con respecto a la posición de *Gavialis gangeticus* y *Tomistoma schlegelii* en los cladogramas del orden (Gatesy *et al.*, 2003, Janke *et al.*, 2005), así como a la monofilia del género *Crocodylus* (McAliley *et al.*, 2006). Esto determinó que muchos aspectos concernientes a relaciones de menor nivel dentro de Crocodylia permanecieran sin solución. Aunque los análisis filogenéticos en los que se incluyó al género *Crocodylus* establecieron una estructura básica de la filogenia, la mayoría de los estudios no incluían a las 12 especies reconocidas o carecían de una adecuada resolución o soporte de las relaciones propuestas (Brochu y McEachran, 2000, McAliley *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2007, Gatesy y Amato, 2008, Meganathan *et al.*, 2010, Man *et al.*, 2011).

Por otra parte, los datos moleculares demostraron que la divergencia genética interespecífica dentro de *Crocodylus* muestra niveles excepcionalmente bajos, producto de una reciente radiación o una velocidad de evolución molecular extremadamente baja dentro del género, comparado con el resto del orden. Como resultado, los marcadores usados para analizar las relaciones interfamiliares no proporcionaban la resolución necesaria para establecer las relaciones dentro del género (Oaks, 2007).

No menos importante resultó el uso de los caracteres morfológicos ya que estos permiten construir una historia filogenética desde una

perspectiva paleontológica (Brochu y McEachran, 2000). Sin embargo, en este grupo un limitado número de caracteres morfológicos diagnósticos han sido utilizados ya que la evolución de la morfología en lo que respecta a la forma del cuerpo ha sido lenta (Feng *et al.*, 2010). Aunque estos caracteres se han codificado en matrices, incluyendo especies vivas y extintas, el alcance completo de las variaciones morfológicas en este grupo no ha sido colocado todavía en un contexto filogenético (Meredith *et al.*, 2011).

Esto determinó que durante mucho tiempo no se contara con una hipótesis filogenética completamente resuelta para los miembros del género *Crocodylus*, el cual representa dentro del orden al más rico en especies, más ampliamente distribuido y ecológicamente diverso (Oaks, 2007). De este modo, la presente revisión se propone como objetivo demostrar la evolución de las relaciones filogenéticas propuestas dentro del orden Crocodylia, a partir del empleo de diferentes caracteres moleculares y morfológicos. Por otro lado, persigue el análisis de la dinámica en las relaciones propuestas como marco contextual para los estudios de genética para la conservación y sistemática molecular de los miembros del género *Crocodylus* que habitan en Cuba.

### Conflictos supragenéricos: el debate *Gavialis*-*Tomistoma*

La posición filogenética de *Gavialis gangeticus* y *Tomistoma schlegelii* (conocido como falso gavial) en los cladogramas del orden, ha sido muy controversial y ha dependido en gran medida del empleo de datos moleculares o morfológicos. Los análisis moleculares muestran que son especies hermanas, cercanamente relacionadas a la familia Crocodylidae (Harshman *et al.*, 2003, Janke *et al.*, 2005, Roos *et al.*, 2007), mientras que los análisis morfológicos/paleontológicos las ubica en diferentes familias: *Tomistoma* en la familia Crocodylidae, cercanamente relacionado al género *Crocodylus* y *Gavialis* es colocada en una posición basal a todos los crocodylianos, siendo la única especie de la familia Gavialidae (Brochu y McEachran, 2000, Brochu, 2003). La relación de estas especies constituye una de las discrepancias más antiguas en relación al uso de los enfoques morfológicos o moleculares en la sistemática, debido a lo contradictorio de sus

resultados (Feng *et al.*, 2010). Desde una perspectiva molecular, un análisis mitogenómico desarrollado por (Janke *et al.*, 2005) colocó a *Gavialis*/*Tomistoma* como el grupo hermano de *Crocodylus*, por lo que propusieron el reconocimiento de solo dos familias de crocodylianos: Alligatoridae y Crocodylidae, incluyendo esta última a los géneros *Crocodylus*, *Osteolaemus*, *Gavialis* y *Tomistoma*. Estudios posteriores sostuvieron esta relación (Roos *et al.*, 2007, Man *et al.*, 2011), la cual es aceptada y reflejada en trabajos recientes (Srikulnath *et al.*, 2015). A pesar de las evidencias antes mencionadas, aún permanece en discusión si Gavialidae es suficientemente diferente como para ser considerada una familia independiente o no, de modo que co-permanece el criterio de tres 'familias' en el orden (Grigg y Kirshner, 2015).

Las explicaciones para la discrepancia entre estas hipótesis filogenéticas están fundamentadas en la naturaleza de los métodos filogenéticos aplicados y sus potenciales limitaciones (Piras *et al.*, 2010). Un ejemplo de ello se considera la ubicación de la raíz en el árbol filogenético; para los datos morfológicos se ha ubicado generalmente a *Gavialis* mientras que los análisis moleculares la colocan en la rama que separa a Alligatoridae (Janke *et al.*, 2005). Por otra parte, la posibilidad de convergencia morfológica o fisiológica fue rechazada pues un análisis ontogénico del cráneo de estas especies demostró que la semejanza fenotípica entre el falso y el verdadero gavial no se debe a convergencia evolutiva, ni a vías ontogénicas similares, reconociendo que son significativamente diferentes desde un punto de vista de la biología del desarrollo (Piras *et al.*, 2010).

Otra hipótesis plantea que la ambigüedad pudiera ser consecuencia de un registro fósil transicional incompleto en este grupo. Aun cuando los análisis morfológicos de todos los fósiles conocidos han sido robustos y tienen un fuerte soporte, la división entre las dos aproximaciones sugiere que todavía existen fósiles que deben ser descubiertos, los cuales posibilitarían la fusión de las dos hipótesis (Willis, 2009).

Si bien todavía existe resistencia a la relación de *Gavialis* como especie hermana de *Tomistoma*, a favor de la posición basal de *Gavialis* respecto a todos los crocodylianos existentes (Piras *et al.*, 2010); la evidencia molecular generada hasta la fecha, sostiene inequívocamente la relación de *Gavialis*/*Tomistoma* dentro de Crocodylidae (Oaks, 2011).

### Inconsistencias en la monofilia del género

#### *Crocodylus*

Otro aspecto debatido durante mucho tiempo fue la monofilia del género *Crocodylus*. Numerosos estudios filogenéticos proponían que la especie antes identificada como *Crocodylus cataphractus* formaba parte del clado compuesto por todos los miembros del género (Brochu y McEachran, 2000, Gatesy *et al.*, 2003). De este modo, se consideraba que el género era monofilético con la inclusión de la mencionada especie. Por otra parte, análisis moleculares colocaban a *C. cataphractus* como especie hermana del cocodrilo enano africano (*Osteolaemus tetraspis*), o bien fuera del clado compuesto por *Osteolaemus* y *Crocodylus*, sugiriendo que el género era parafilético.

Un amplio análisis filogenético en el que se emplearon marcadores moleculares nucleares y mitocondriales, demostró que *C. cataphractus* posee un nivel de divergencia genética igual o mayor a la que se observa entre los géneros *Crocodylus* y *Osteolaemus*. Esta evidencia molecular complementada con un análisis morfológico sentó las bases para la resurrección del género *Mecistops* para la especie *C. cataphractus*. De esta manera, *Mecistops cataphractus* se convirtió en el único representante de este género, considerado un linaje antiguo y endémico del continente Africano (McAliley *et al.*, 2006).

Estudios posteriores demostraron que *Mecistops* es especie hermana de *Osteolaemus*, y que estos géneros Africanos representan un único grupo divergente, hermano de *Crocodylus* (Oaks, 2011, Gatesy y Amato, 2008). Esta relación se ha corroborado en numerosos estudios de sistemática molecular en Crocodylia (Meredith *et al.*, 2011, Hekkala *et al.*, 2011, Shirley *et al.*, 2014), lo cual permite la aceptación del nuevo género. Sin embargo, *Mecistops* requiere aun de una descripción formal (Grigg y Kirshner, 2015).

Recientemente, el uso de rigurosos métodos moleculares y morfológicos para la delimitación de especies permitió demostrar que *M. cataphractus* está compuesto además por múltiples especies, distribuidas en dos zonas biogeográficas fundamentales. Para esto se analizaron 11 genes mitocondriales y nucleares, así como caracteres morfológicos craneales en más de 100 individuos que cubrían toda la zona de distribución de esta especie. El uso combinado de estos caracteres permitió la

identificación inequívoca de dos especies de *Mecistops* que habitan indistintamente en el Centro y Oeste de África (Shirley *et al.*, 2014). Curiosamente un análisis de individuos cautivos en zoológicos de Estados Unidos demostró que todos provenían del Oeste de África (Shirley *et al.*, 2015) por lo que ningún estudio filogenético previo a (Shirley *et al.*, 2014) pudo identificar especies divergentes de *Mecistops* (e.j. (McAliley *et al.*, 2006, Oaks, 2011). Esto confirma como el uso de muestras de individuos de los que se tiene poca información, o cuyo origen geográfico se desconoce, puede afectar la interpretación de los estudios filogenéticos y la delimitación de especies raras o en peligro.

El reconocimiento de estas especies crípticas tiene implicaciones significativas para la conservación del género *Mecistops* en África. Las poblaciones del Oeste pueden estar en peligro crítico de extinción, mientras que en el Centro se plantea existen varias poblaciones bien representadas (Shirley *et al.*, 2014).

### Diversidad críptica en otros crocodylianos de África

A pesar del amplio debate respecto a la taxonomía del género *Osteolaemus*, este fue considerado durante mucho tiempo como monotípico, siendo *O. tetraspis* la única especie reconocida. Un estudio filogenético, filogeográfico y taxonómico del cocodrilo enano africano proporcionó evidencia convincente para el reconocimiento de tres linajes evolutivos divergentes de *Osteolaemus*. Basado en esta información y teniendo en cuenta la historia taxonómica del grupo se propuso la existencia de tres especies diferentes: *O. osborni*, *O. tetraspis* y *O.sp. nov* (Eaton *et al.*, 2009). Análisis posteriores en los que se utilizaron otros marcadores moleculares y morfológicos, así como muestras del medio natural, corroboraron la existencia de tres linajes divergentes en tres regiones biogeográficas diferentes del oeste de África (Shirley *et al.*, 2014, Shirley *et al.*, 2015). Elevar estos linajes a la categoría de especies diferentes es de gran importancia para delimitar su estatus de conservación y desarrollar estrategias prácticas para su conservación y manejo que garanticen su sustentabilidad a largo plazo (Eaton *et al.*, 2009, Oaks, 2011).

El cocodrilo del Nilo (*Crocodylus niloticus*), reconocido como una sola entidad, se consideraba una especie ampliamente distribuida y comercialmente explotada que ocupaba 47 países del

Continente Africano, incluyendo Madagascar. Históricamente, se habían observado un gran número de diferencias morfológicas entre sus principales poblaciones, y varias subespecies habían sido propuestas (Hekkala *et al.*, 2010). La diferenciación genética entre las poblaciones de *C. niloticus* exhibida a partir de marcadores microsatélites revelaron niveles de variación que se correspondieron con una marcada estructuración biogeográfica a la largo de toda su distribución. Estas mostraron de manera particular valores de diferenciación genética intraespecífica que a menudo son atribuidas a diferencias interespecíficas en otros grupos (Hekkala *et al.*, 2010).

Estudios filogenéticos posteriores emplearon marcadores mitocondriales y nucleares, así como un análisis del número y estructura de los cromosomas, para evaluar la monofilia del cocodrilo del Nilo (Hekkala *et al.*, 2011). Para esto se utilizaron muestras de todo el Continente, cubriendo las principales biorregiones, así como especímenes de museo (cocodrilos momificados), con el objetivo de reconstruir el perfil genético de poblaciones extirpadas. Toda la evidencia recopilada mostró la existencia de un linaje evolutivo críptico en las poblaciones del Oeste de África. Por su parte, el análisis de los especímenes momificados indicó que este podía adjudicarse a *Crocodylus suchus*, previamente descrito, todo lo cual sugirió que ambos linajes de *Crocodylus* africanos habitaron históricamente el Río Nilo (Hekkala *et al.*, 2011, Cunningham *et al.*, 2016). En cuanto a las relaciones filogenéticas se observó que el clado del Oeste (*C. suchus*) era especie hermana de un clado monofilético formado por las especies del Continente Americano y *C. niloticus*.

Estos resultados permitieron aclarar aspectos concernientes a la historia evolutiva y biogeográfica del género y a la taxonomía actual de *C. niloticus*. De igual forma demostraron la existencia de una mayor diversidad dentro del género *Crocodylus* que la considerada hasta ese momento. El reconocimiento adecuado de este linaje críptico como *C. suchus* resulta de vital importancia para su conservación. Dicha especie está considerada en peligro de extinción debido a su restringida distribución, que incluye además a países donde no existen regulaciones sobre el comercio ilegal de pieles o carne y donde tiene lugar la destrucción de su hábitat

(Hekkala *et al.*, 2011). Una redescrición de este clado en gran parte del Oeste de África está actualmente en proceso (Cunningham *et al.*, 2016).

Todos los casos discutidos demuestran la existencia de especies crípticas de crocodylianos altamente divergentes, resaltando la necesidad de un reconocimiento formal de estas y la consideración de las amenazas regionales que enfrentan, para su efectiva conservación *in situ/ex situ*.

El reconocimiento de los crocodylianos como especies de cierto dinamismo evolutivo, más que como “fósiles vivientes”, sujetos a una limitada percepción de divergencias morfológicas (Hekkala *et al.*, 2011), constituye una premisa fundamental para el desarrollo de análisis filogeográficos y filogenómicos integrales. Esto es de particular importancia para especies que muestran una amplia distribución y posibilita así la detección de nuevas especies crípticas.

### Sistemática molecular del género *Crocodylus*

Los numerosos estudios filogenéticos enfocados en el análisis de las relaciones interespecíficas entre los miembros del género *Crocodylus* han sido muy heterogéneos en las relaciones propuestas (Gatesy y Amato, 2008, Li *et al.*, 2007, Meganathan *et al.*, 2010). En la mayoría de los árboles generados se ha observado que las especies de *Crocodylus* que se agrupan juntas, están relacionadas geográficamente. En consecuencia, se han identificado dos clados principales: el del Nuevo Mundo y el Indo-Pacífico. El linaje de los cocodrilos del Nuevo Mundo está formado por las especies *C. acutus*, *C. rhombifer*, *C. intermedius* y *C. moreletii* y este grupo incluye como especies hermanas a *C. niloticus* y *C. suchus*. En tanto, el clado Indo-Pacífico incluye a las especies *C. novaeguineae*, *C. mindorensis*, *C. siamensis*, *C. porosus*, *C. johnstoni* y *C. palustris* (Meganathan *et al.*, 2010, Meredith *et al.*, 2011).

La posición filogenética de la mayoría de las especies del género no ha estado clara hasta el presente y los resultados han sido inconsistentes en las relaciones propuestas. El primer trabajo de filogenia de *Crocodylus* en el que se utiliza la secuencia del genoma mitocondrial (ADNmt) completo, tuvo un interés especial en la posición de *C. porosus* (Meganathan *et al.*, 2010). En la topología recobrada se observó el agrupamiento de los cocodrilos del Nuevo Mundo, pero no fue así para el

linaje Indo-Pacífico. Se obtuvo una buena resolución para las relaciones entre *C. novaeguineae*-*C. mindorensis*, *C. acutus*-*C. intermedius* y *C. porosus*-*C. siamensis*, esta última había sido previamente informada, pero con un bajo soporte del nodo (McAliley *et al.*, 2006). Sin embargo, no se pudo establecer la posición de *C. palustris* y *C. johnstoni*, por lo que no se pudo determinar la especie más cercana al clado *C. porosus*-*C. siamensis* (Meganathan *et al.*, 2010).

Un nuevo análisis en el que se incluyeron cinco de las especies Indopacíficas (excepto *C. johnstoni*) mantuvo inalterado el clado formado por *C. novaeguineae*-*C. mindorensis* (Man *et al.*, 2011). En cambio, la relación *C. porosus*-*C. siamensis* no se mantuvo, sino que se obtuvo un clado formado por *C. palustris*-*C. siamensis*. Esto se corresponde con lo planteado por (Li *et al.*, 2007), pero se contrapone al resultado obtenido por (Feng *et al.*, 2010, Meganathan *et al.*, 2010, Meganathan *et al.*, 2011), así como a la asociación *C. porosus*-*C. palustris* propuesta por (Gatesy y Amato, 2008).

Esta heterogeneidad en las relaciones propuestas demuestra como el uso de diferentes datos e individuos con diferentes orígenes, genera múltiples relaciones interespecíficas y que las relaciones filogenéticas dentro del género *Crocodylus* son mucho menos estables que las relaciones intergenéricas (Man *et al.*, 2011).

El primer estimado filogenético del género *Crocodylus* completamente resuelto, estuvo basado exclusivamente en el análisis del genoma mitocondrial completo (Meredith *et al.*, 2011). En este se obtuvieron clados consistentemente resueltos, incluyendo el agrupamiento de los cocodrilos del Nuevo Mundo y su relación con las especies africanas, la relación *C. acutus*-*C. intermedius*, *C. mindorensis*-*C. novaeguineae* y la monofilia de las especies Indo-Pacíficas. La relación entre *C. siamensis*, *C. porosus* y *C. palustris* no quedó esclarecida ya que las dos muestras de *C. siamensis* utilizadas mostraron relaciones diferentes, posiblemente porque una de ellas representaba a un híbrido *C. siamensis* x *C. porosus* (Meredith *et al.*, 2011). Sin embargo, los autores plantearon que la relación entre *C. siamensis*-*C. porosus* es menos precisa y recomendaron usar más datos, preferiblemente de individuos *C. siamensis* muestreados en el medio natural para confirmar los

resultados. Justamente, luego se demostraría que el genoma mitocondrial de *C. siamensis* publicado por (Ji *et al.*, 2008) y que fue utilizado en los análisis de (Meganathan *et al.*, 2010) y (Meredith *et al.*, 2011), debió ser un híbrido o una marcada variación intraespecífica de *C. porosus* (Srikulnath *et al.*, 2012). Las diferencias entre los dos genomas de *C. siamensis* resultaron ser del orden de variación encontrado entre especies diferentes del género *Crocodylus*. El nuevo haplotipo de *C. siamensis* resultó estar más cercanamente relacionado a *C. palustris* (Srikulnath *et al.*, 2012).

Debido a que en el genoma mitocondrial todos los genes están ligados y es común la introgresión entre especies, a menudo pueden confundirse los árboles de genes con árboles de especies. Por lo tanto, la única forma de demostrar que el patrón filogenético del estudio mitogenómico coincide con el patrón a nivel de especie, es analizando evidencia adicional a partir del genoma nuclear, caracteres morfológicos y especies extintas. De esta manera se puede determinar si el resultado del ADNmt es una singularidad o un patrón evolutivo general, al ser corroborado por caracteres independientes (Gatesy y Amato, 2008, Meredith *et al.*, 2011).

En este sentido (Oaks, 2011) analizó varios *loci* nucleares para complementar los datos de las secuencias del genoma mitocondrial y además procesó tamaños de muestra de entre uno y diez individuos para todas las especies de crocodylianos reconocidas. Hasta la fecha su trabajo reúne la mayor cantidad de datos moleculares usados para estudiar la filogenia del orden Crocodylia, tanto en número de *loci*, como en individuos muestreados. Como resultado obtuvo un árbol para todas las especies de crocodylianos completamente resuelto, con fuerte soporte y calibrado en el tiempo, proponiendo una nueva y compleja interpretación de la historia evolutiva de *Crocodylus*.

Entre los aspectos más importantes de la filogenia de *Crocodylus* analizados por (Oaks, 2011), se encuentra la parafilia del linaje Indo-Pacífico. De acuerdo a sus resultados, tres de las especies Indopacíficas (*C. siamensis*, *C. porosus* y *C. palustris*) comparten un ancestro común con el clado formado por las especies del Nuevo Mundo y las africanas. Esta relación contrasta con el análisis llevado a cabo por (Man *et al.*, 2011) y (Meredith *et al.*, 2011), los que sostienen la monofilia del grupo. Este resultado

podiera deberse a un fenómeno de reordenamiento incompleto de linajes, debido a los recientes eventos de especiación considerados para el género. De acuerdo con (Grigg y Kirshner, 2015) la interpretación de (Oaks, 2011) pareciera ser zoogeográficamente discordante.

Otro elemento discutido es la relación entre las especies *C. siamensis*, *C. porosus* y *C. palustris*. En este caso el análisis de diez *loci* y múltiples individuos por especies, confirma que *C. siamensis* es especie hermana de *C. palustris*, y que *C. porosus* es la especie hermana de este clado. De igual forma se corrobora la relación entre *C. mindorensis*-*C. novaeguineae*, mientras que *C. johnstoni* resulta ser la especie hermana de este clado. De manera general el autor sugiere que se necesitan muestras de estas especies en su medio natural para poder entender mejor la diversidad y las relaciones evolutivas en esta región (Oaks, 2011).

Con respecto a las especies del Continente Americano, se confirmó la relación entre *C. acutus*-*C. intermedius* y *C. rhombifer*-*C. moreletii*. A pesar de que cuando se realizó este trabajo no se había aceptado el cambio taxonómico para la población de *C. niloticus* del Oeste de África (actualmente *C. suchus*), se reconoce la existencia de dos poblaciones separadas cercanamente relacionadas al clado del Nuevo Mundo (Oaks, 2011). Resulta importante resaltar que a pesar de confirmarse la aparentemente estable relación *C. acutus* - *C. intermedius*, en el estudio molecular más completo realizado hasta el presente para el género (Oaks, 2011), dicha relación está en contraposición con la revelada a partir del empleo de muestras de *C. acutus* de las Antillas (Milián-García *et al.*, 2011, Milián-García, 2015, Milián-García *et al.*, 2015). Los estudios con la inclusión de *C. acutus* antillano, muestran a esta como especie hermana de *C. rhombifer* y en cambio a *C. acutus* continental asociado a *C. intermedius* sugiriendo al cocodrilo americano como especie parafilética (Fig. 1).

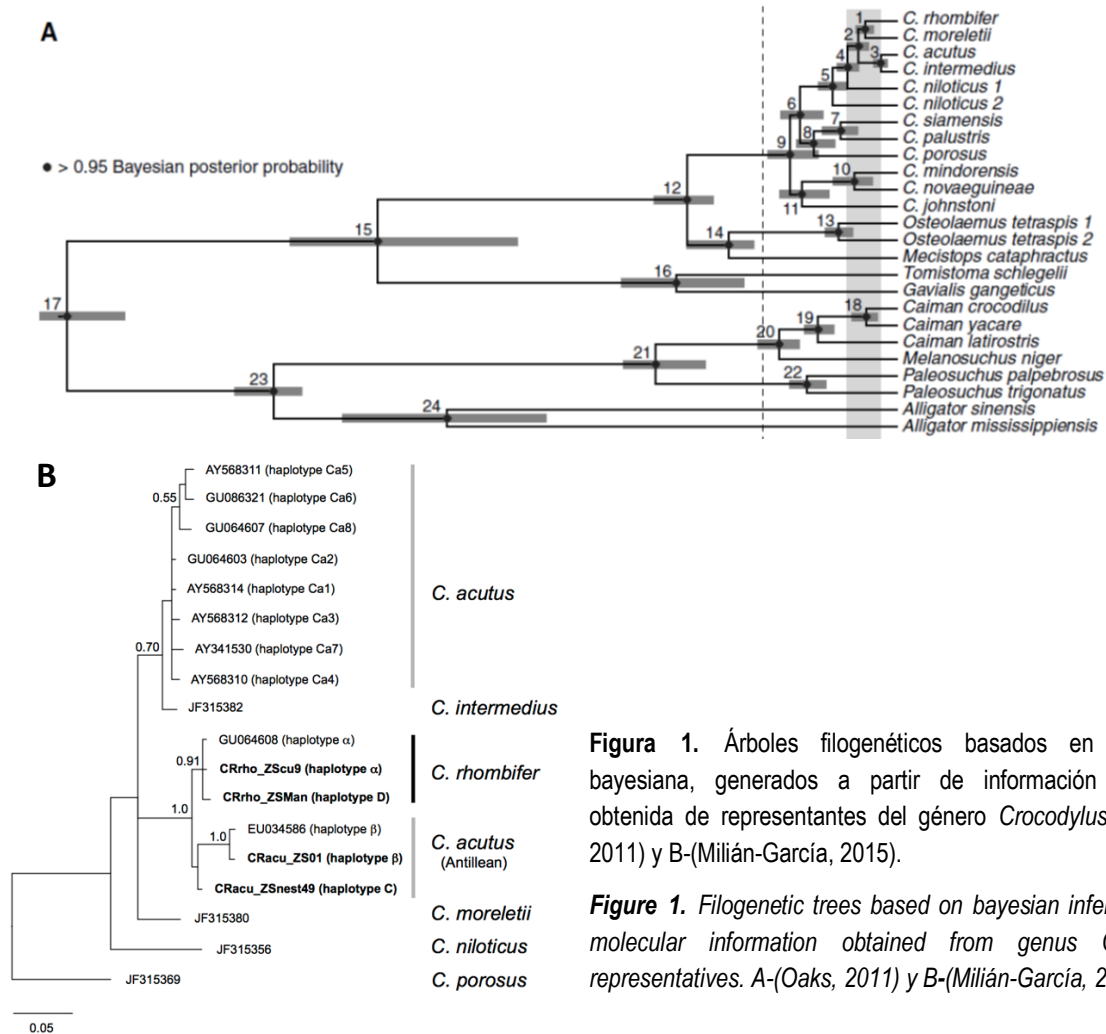
#### **Sistemática molecular de las especies del género *Crocodylus* en Cuba**

En el complejo escenario descrito anteriormente, dada las relaciones filogenéticas propuestas para las especies de *Crocodylus*, el latente debate respecto al número de familias en el orden, así como la identificación de una diversidad mayor que la

tradicionalmente considerada; se enmarcan los estudios de caracterización genética de los miembros del género *Crocodylus* que habitan en Cuba.

El cocodrilo cubano (*C. rhombifer*) presenta la menor distribución geográfica entre los crocodylianos del Nuevo Mundo, pues se encuentra en gran parte limitado a la Ciénaga de Zapata en la provincia de Matanzas. No obstante, en el pasado tuvo una mayor distribución, pues se han encontrado restos fósiles en Islas Caimán y Bahamas (Milián-García *et al.*, 2014, Franz *et al.*, 1995). El cocodrilo americano (*C. acutus*) habita en simpatria con el cocodrilo cubano en la Ciénaga de Zapata, mientras que se encuentra en alopatria en el resto de las áreas costeras de la Isla. Esta última es una especie abundante y ampliamente distribuida, encontrándose en el extremo sur de la Florida, en las costas del Atlántico y Pacífico desde México hasta el norte de América del Sur, incluyendo islas del Caribe como Jamaica, República Dominicana y Haití (Thorbjarnarson *et al.*, 2010).

Al examinar la diversidad de los linajes de la Isla de Cuba, se encontró que *C. rhombifer* y *C. acutus* son genéticamente más cercanos entre sí que lo que cualquiera de ellos es a *C. acutus* Continental (Milián-García *et al.*, 2011, Milián-García *et al.*, 2015, Milián-García, 2015). El análisis de *loci* microsatélites y ADNmt demostró que aunque las especies cubanas son claramente distinguibles morfológicamente (Fig. 2), están evolutivamente más relacionadas. Esto significa que el cocodrilo americano que habita en Cuba exhibe características morfológicas y ecológicas de *C. acutus*, pero a nivel del ADNmt es genéticamente más parecido al cocodrilo cubano (Milián-García *et al.*, 2015, Milián-García *et al.*, 2011); probablemente a causa de un evento de captura mitocondrial debido a un proceso de hibridación ancestral (Rodríguez *et al.*, 2011), pero no demostrado hasta el presente. De hecho, el fenómeno de hibridación que se ha demostrado ocurre y ocurrió ancestralmente entre estas especies, se propone como modulador clave del grado de diferenciación genética que ha determinado la formación de tres linajes fundamentales: *C. rhombifer*, *C. acutus* Antillano y *C. acutus* del Continente (Milián-García *et al.*, 2015). Un reordenamiento incompleto de linajes como resultado de una diversificación reciente de estas especies en el Caribe, pudiera ser otro elemento con marcada influencia en las relaciones observadas.



**Figura 1.** Árboles filogenéticos basados en inferencia bayesiana, generados a partir de información molecular obtenida de representantes del género *Crocodylus*. A-(Oaks, 2011) y B-(Milián-García, 2015).

**Figure 1.** Phylogenetic trees based on bayesian inference from molecular information obtained from genus *Crocodylus* representatives. A-(Oaks, 2011) y B-(Milián-García, 2015).



**Figura 2.** Fotografía de *Crocodylus rhombifer* (izquierda) y *Crocodylus acutus* (derecha), ilustrando diferencias morfológicas reconocidas entre las especies (Fotos del autor).

**Figure 2.** Picture of *Crocodylus rhombifer* (left) and *Crocodylus acutus* (right), illustrating morphological differences recognized among species (pictures from the author).



La marcada diferenciación genética intraespecífica que muestra *C. acutus* apunta a la existencia de un linaje críptico del cocodrilo americano que habita actualmente en Cuba y en otras localidades de las Antillas, lo que constituye un reto para la taxonomía actual. Tres hipótesis pudieran plantearse para explicar la poca diferenciación a nivel del ADNmt entre el cocodrilo cubano y el cocodrilo americano que habita en el Caribe, así como la marcada diferenciación de este último con sus congéneres continentales. Primero, *C. rhombifer* pudiera ser considerado una subespecie de *C. acutus* y por tanto estaríamos en presencia de una sola especie de *Crocodylus* en Cuba con una marcada variabilidad morfológica y etológica. Es decir, la subespecie más representada (*C. rhombifer*) no ha acumulado la cantidad de cambios a nivel molecular que se reconocen para especies distintas dentro del género *Crocodylus*. Segundo, *C. acutus* de Cuba pudiera ser asignado a *C. rhombifer*, resultando ambos de una diversificación reciente. Estas dos hipótesis implicarían que las diferencias morfológicas y etológicas entre estos dos linajes fueran de poco valor taxonómico. Tercero, *C. acutus* de Cuba pudiera representar una nueva especie con poca variación morfológica, pero marcada variación genética respecto al linaje continental (Milián-García *et al.*, 2011).

La habilidad para evaluar con mayor soporte el estatus taxonómico de *C. rhombifer* y del linaje críptico antillano de *C. acutus* requiere del aumento de la cantidad de individuos de *C. acutus* muestreados, su representatividad en el área de distribución, así como las secuencias del genoma nuclear y mitocondrial utilizadas en el análisis. Esto permitirá esclarecer definitivamente la relación entre las especies cubanas y colocarlas en el contexto de variación que muestra *C. acutus* en su área de distribución (Milián-García *et al.*, 2015).

Un denominador común en todos los casos discutidos es el hecho de que el entendimiento adecuado de la historia natural, a menudo compleja, de especies que habitan en amplias regiones geográficas, puede elucidar patrones actuales de biodiversidad. El proceso de estructuración geográfica de los linajes que resulta de la alopatría puede ser más común en especies ampliamente distribuidas, sujetas a procesos biogeográficos y ecogeográficos a escala continental o regional

(Shirley *et al.*, 2014). En este sentido, la identificación de patrones de diversidad genética intraespecífica, así como de las unidades de manejo apropiadas, constituyen elementos clave en la conservación y manejo de los crocodylianos que muestran una amplia distribución. En el caso particular de *C. acutus*, un análisis filogeográfico preliminar reveló un grado significativo de variación en la estructura genética de sus poblaciones (Weaver *et al.*, 2008, Rodríguez *et al.*, 2011) lo que pudiera justificar la necesidad de una revisión taxonómica de la especie (Milián-García *et al.*, 2011).

Sin embargo, a pesar de su amplia distribución geográfica y estatus Vulnerable de acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2016), la ausencia de información genética suficiente, la falta de representatividad en toda su área de distribución, así como el análisis de muestras de un origen geográfico desconocido, han imposibilitado establecer el alcance real de la diversidad genética y estructura en esta especie (Bloor *et al.*, 2015).

### Conclusiones

Los crocodylianos constituyen un grupo ecológicamente clave que poseen una historia evolutiva compleja. Aunque de modo general han sido considerados un grupo antiguo, ampliamente distribuido y relativamente homogéneo, el panorama actual revela la existencia de una considerable diversificación intraespecífica. Esto demuestra la necesidad de reconocer a los crocodylianos como un complejo de especies, para las cuales la taxonomía tradicional pone a relieve las limitaciones de los criterios de identificación. La evidencia presentada subraya la necesidad del desarrollo de análisis filogeográficos exhaustivos para las especies reconocidas dentro de *Crocodylia*, lo que permitirá detectar nuevas especies crípticas. Es ampliamente aceptado que la verdadera diversidad del orden no está representada por la taxonomía actual.

Aun cuando los estudios de mitogenómica y la combinación de varios *loci* nucleares y mitocondriales proporcionaron la solución para algunos conflictos en las relaciones filogenéticas, todavía no se cuenta con un árbol completamente resuelto de *Crocodylus*. La ausencia de un conjunto de marcadores informativos, el uso de muestras de origen desconocido y la amplia hibridación entre especies, constituyen algunos de los

factores que han afectado la resolución en los estudios de sistemática molecular.

La presente revisión revela que las relaciones entre especies a nivel del orden Crocodylia no han sido estables a lo largo del tiempo. En primera instancia, influido por una evaluación de las relaciones entre especies a partir exclusivamente de caracteres morfológicos o moleculares. Lo anterior resalta la necesidad de la combinación e integración de la información generada desde distintas aproximaciones: molecular, morfológica, ecológica, etológica, registro fósil, etc. Por otro lado, la falta del reconocimiento preciso de la riqueza de especies en el orden limita el entendimiento de las relaciones interespecíficas. Un grupo significativo de estudios han revelado que el orden Crocodylia está integrado por un número mucho mayor de especies que el que se ha reconocido de manera tradicional. Dicho esto, resulta imposible establecer las relaciones e historia evolutiva de todos los reptiles que integran este grupo, sin conocer con exactitud cuántos miembros lo componen. Lo antes mencionado tiene grandes implicaciones no solo por su aporte a la dilucidación de aspectos básicos de la historia evolutiva de las especies miembros, sino también en la conservación de las mismas. Ninguna estrategia de manejo y conservación de especies pudiera ser efectiva sin reconocer la diversidad de las entidades que pretende preservar.

Resulta un llamado de atención el número de especies crípticas revelado a través de los estudios de sistemática molecular en el orden. Esto último, a pesar de que los crocodylianos son considerados los reptiles más prominentes a nivel mundial. Es precisamente en este contexto que se enmarcan los estudios de sistemática molecular para las especies del género *Crocodylus* que habitan en Cuba. Los patrones observados a este nivel se apoyan en lo observado para especies congéneres y resaltan la importancia de los estudios moleculares dentro de los cuales se distinguen los promisorios estudios de genómica para la conservación.

#### LITERATURA CITADA

- Bloor, P., Ibanez, C. y T. A. Vilorio-Lagares. 2015. Mitochondrial DNA analysis reveals hidden genetic diversity in captive populations of the threatened American crocodile (*Crocodylus acutus*) in Colombia. *Ecol Evol*, 5, 130-40.
- Brochu, C. A. 2003. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 31, 357-397.
- Brochu, C. A. y J. Meechran. 2000. Phylogenetic relationships and divergence timing of *Crocodylus* based on morphology and the fossil record. *Copeia*, 2000, 657-673.
- Cunningham, S. W., M. H. Shirley y E. R. Hekkala. 2016. Fine scale patterns of genetic partitioning in the rediscovered African crocodile, *Crocodylus suchus* (Saint-Hilaire 1807). *PeerJ*, 4, e1901.
- Eaton, M. J., A. Martin, J. Thorbjarnarson y G. Amato. 2009. Species-level diversification of African dwarf crocodiles (Genus *Osteolaemus*): a geographic and phylogenetic perspective. *Mol Phylogenet Evol*, 50, 496-506.
- Feng, G., X. Wu, P. Yan y X. Li. 2010. Two complete mitochondrial genomes of *Crocodylus* and implications for crocodylians phylogeny. *Amphibia-reptilia*, 31, 299-309.
- Franz, R., G. Morgan y S. D. Bucker. 1995. Fossil skeleton of a Cuban crocodile (*Crocodylus rhombifer*) from a blue hole on Abaco, Bahamas. *Caribbean Journal of Science*, 31(1/2):149-.
- Gatesy, J. y G. Amato. 2008. The rapid accumulation of consistent molecular support for intergeneric crocodylian relationships. *Mol Phylogenet Evol*, 48, 1232-7.
- Gatesy, J., G. Amato, M. Norell, R. Desalle y C. Hayashi. 2003. Combined support for wholesale taxic atavism in gavialine crocodylians. *Syst Biol*, 52, 403-22.
- Grigg, G. y D. Kirshner. 2015. *Biology and evolution of crocodylians*, CSIRO PUBLISHING.
- Harshman, J., C. J. Huddleston, J. P. Bollback, T. J. Parsons y M. J. Braun. 2003. True and false gharials: a nuclear gene phylogeny of crocodylia. *Syst Biol*, 52, 386-402.
- Hekkala, E., M. H. Shirley, G. Amato, J. D. Austin, S. Charter, J. Thorbjarnarson, K. A. Vliet, M. L. Houck, R. Desalle y M. J. Blum. 2011. An ancient icon reveals new mysteries: mummy DNA resurrects a cryptic species within the Nile crocodile. *Mol Ecol*, 20, 4199-215.
- Hekkala, E. R., G. Amato, R. Desalle y M. J. Blum. 2010. Molecular assessment of population differentiation and individual assignment potential of Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) populations. *Conservation Genetics*, 11, 1435-1443.
- IUCN 2016. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2016, pp.
- Janke, A., A. Gullberg, S. Hughes, R. K. Aggarwal y U. Arnason. 2005. Mitogenomic analyses place the gharial (*Gavialis gangeticus*) on the crocodile tree and provide pre-K/T divergence times for most crocodylians. *J Mol Evol*, 61, 620-6.
- Ji, X., X. Wu, P. Yan y G. Amato. 2008. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of Siamesis Crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Mol Biol Rep*, 35, 133-8.
- Li, Y., X. Wu, X. Ji, P. Yan y G. Amato. 2007. The complete mitochondrial genome of salt-water crocodile (*Crocodylus porosus*) and phylogeny of crocodylians. *J Genet Genomics*, 34, 119-28.
- Man, Z., W. Yishu, Y. Peng y W. Xiaobing. 2011. Crocodylian phylogeny inferred from twelve mitochondrial protein-coding genes, with new complete mitochondrial genomic sequences for *Crocodylus acutus* and *Crocodylus novaeguineae*. *Mol Phylogenet*

- Evol, 60, 62-7.
- Mcaliley, L. R., R. E. Willis, D. A. Ray, P. S. White, C. A. Brochu y L. D. Densmore. 2006. Are crocodiles really monophyletic?—Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Mol Phylogenet Evol*, 39, 16-32.
- Meganathan, P. R., B. Dubey, M. A. Batzer, D. A. Ray y I. Haque. 2010. Molecular phylogenetic analyses of genus *Crocodylus* (Eusuchia, Crocodylia, Crocodylidae) and the taxonomic position of *Crocodylus porosus*. *Mol Phylogenet Evol*, 57, 393-402.
- Meganathan, P. R., B. Dubey, M. A. Batzer, D. A. Ray, y I. Haque. 2011. Complete mitochondrial genome sequences of three *Crocodylus* species and their comparison within the Order Crocodylia. *Gene*, 478, 35-41.
- Meredith, R. W., E. R. Hekkala, G. Amato y J. Gatesy. 2011. A phylogenetic hypothesis for *Crocodylus* (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Mol Phylogenet Evol*, 60, 183-91.
- Milián-García, Y. 2015. Caracterización genética del género *Crocodylus* (Crocodylia: Crocodylidae) en Cuba mediante el empleo de marcadores nucleares y mitocondriales. Universidad de la Habana.
- Milián-García, Y., R. Ramos-Targarona, E. Perez-Fleitas, G. Sosa-Rodríguez, L. Guerra-Manchena, M. Alonso-Tabet, G. Espinosa-Lopez y M. A. Russello. 2015. Genetic evidence of hybridization between the critically endangered Cuban crocodile and the American crocodile: implications for population history and in situ/ex situ conservation. *Heredity* (Edinb), 114, 272-80.
- Milián-García, Y., M. A. Russello, y G. Espinosa. 2014. Genética para la Conservación del género *Crocodylus* en Cuba: Pasado, presente y futuro. En: ALICANTE, U. D. (ed.) Los Crocodylia de Cuba.
- Milián-García, Y., M. Venegas-Anaya, R. Frias-Soler, A. J. Crawford, et al. 2011. Evolutionary history of Cuban crocodiles *Crocodylus rhombifer* and *Crocodylus acutus* inferred from multilocus markers. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 315, 358-75.
- Oaks, J. R. 2007. Phylogenetic systematics, biogeography, and evolutionary ecology of the true crocodiles (Eusuchia: Crocodylidae: Crocodylus). A Thesis submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical college.
- Oaks, J. R. 2011. A time-calibrated species tree of Crocodylia reveals a recent radiation of the true crocodiles. *Evolution*, 65, 3285-97.
- Piras, P., P. Colangelo, D. C. Adams, A. Buscalioni, et al. 2010. The Gavialis-Tomistoma debate: the contribution of skull ontogenetic allometry and growth trajectories to the study of crocodylian relationships. *Evol Dev*, 12, 568-79.
- Rodríguez, D., M. R. Forstner, P. E. Moler, J. A. Wasilewski, et al. 2011. Effect of human-mediated migration and hybridization on the recovery of the American crocodile in Florida (USA). *Conservation genetics*, 12, 449-459.
- Roos, J., R. K. Aggarwal y A. Janke. 2007. Extended mitogenomic phylogenetic analyses yield new insight into crocodylian evolution and their survival of the Cretaceous-Tertiary boundary. *Mol Phylogenet Evol*, 45, 663-73.
- Shirley, M., V. Villanova, K. Vliet y J. Austin. 2015. Genetic barcoding facilitates captive and wild management of three cryptic African crocodile species complexes. *Animal Conservation*, 18, 322-330.
- Shirley, M. H., K. A. Vliet, A. N. Carr y J. D. Austin 2014. Rigorous approaches to species delimitation have significant implications for African crocodylian systematics and conservation. *Proc Biol Sci*, 281, 20132483.
- Srikulnath, K., W. Thapana y N. Muangmai. 2015. Role of Chromosome Changes in *Crocodylus* Evolution and Diversity. *Genomics Inform*, 13, 102-11.
- Srikulnath, K., A. Thongpan, A. Suputtitad y S. Apisitwanich. 2012. New haplotype of the complete mitochondrial genome of *Crocodylus siamensis* and its species-specific DNA markers: distinguishing *C. siamensis* from *C. porosus* in Thailand. *Mol Biol Rep*, 39, 4709-17.
- Thorbjarnarson, J. B., S. Manolis y C. Stevenson 2010. American crocodile *Crocodylus acutus*. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 3ra Ed., S.C. Manolis y C. Stevenson. Crocodile Specialist Group: Darwin, 46-53.
- Weaver, J. P., D. Rodríguez, M. Venegas-Anaya, J. R. Cedeno-Vazquez, et al. 2008. Genetic characterization of captive Cuban crocodiles (*Crocodylus rhombifer*) and evidence of hybridization with the American crocodile (*C. acutus*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 309, 649-60.
- Willis, R. E. 2009. Transthyretin gene (TTR) intron 1 elucidates crocodylian phylogenetic relationships. *Mol Phylogenet Evol*, 53, 1049-54.



Editor para correspondencia: Dr. Dennis Denis