



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RELACIÓN DE LA PATERNIDAD MÚLTIPLE CON EL ÉXITO DE ECLOSIÓN Y EL
ÍNDICE DE CONDICIÓN RELATIVO EN CRÍAS DE *Lepidochelys olivacea*
(ESCHSCHOLTZ, 1829), EN PLAYA DE ESCOBILLA, OAXACA, MÉXICO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA

PRESENTA

Biol. Liliana González Cortés

DIRECTORA

Dra. Valentina Islas Villanueva

CO-DIRECTORA

M. en C. Samantha G. Karam Martínez

Puerto Ángel, Oaxaca, México.

Julio, 2020

Resumen

Los sistemas de apareamiento son variados entre las especies, uno de los más comunes es la poliandria, es decir, el apareamiento de una hembra con múltiples machos. Una de las consecuencias de la poliandria es la paternidad múltiple, la cual se ha sugerido que puede proveer de beneficios genéticos a la descendencia como la adquisición de buenos genes o el incremento en la diversidad genética. La paternidad múltiple ha sido comprobada en todas las especies de tortugas marinas, y diversos estudios han analizado su relación con el éxito en la fertilización, el desarrollo embrionario y la supervivencia de las crías. En particular, en la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), se ha encontrado paternidad múltiple entre el 25% y el 92% de las nidadas en diferentes playas, tanto de anidación solitaria como en playas de arribada, sin que se hayan encontrado resultados contundentes con respecto a que existan beneficios para la descendencia. Es por ello que en el presente estudio se evaluó el efecto de la paternidad múltiple en las crías de tortuga golfina. Se obtuvo DNA genómico de un total de 282 muestras, (10 hembras adultas, 237 crías y 35 réplicas seleccionadas al azar), colectadas durante la temporada de anidación del 2016-2017 en Playa de Escobilla, que corresponden a las arribadas del mes de septiembre de 2016, noviembre del mismo año y febrero de 2017. Se realizó la amplificación de seis microsatélites para evaluar la relación que hay, entre la paternidad múltiple y el éxito de eclosión de las nidadas y con el índice de condición relativo (ICr) de las crías. Se detectó paternidad múltiple en el 60% de las nidadas analizadas, y se estimó un máximo de nueve padres y un mínimo de dos. Se encontró una relación inversamente proporcional entre la paternidad múltiple y el éxito de eclosión, y no se encontró una relación entre la paternidad múltiple y el ICr de las crías, aunque el nido con seis padres presentó los valores más altos de ICr, por lo que esto puede sugerir que existe un número de padres óptimo para que las crías alcancen los pesos y las tallas más grandes, pero sería necesario analizar un mayor número de nidos con diferentes niveles de paternidad múltiple para corroborar esta tendencia.

Palabras clave: Poliandria, tortuga golfina, microsatélites, arribada, Pacífico mexicano.



Abstract

Mating systems are varied between species, polyandry is one of the most common, whereby the female mates with different males for gamete fertilization. One of the consequences of polyandry is multiple paternity, it has been suggested that polyandry provides genetic benefits acquiring “good genes” or enhancing genetic diversity in the offspring. Multiple paternity has been observed in all sea turtle’s species, and several studies have analyzed its relation with fertilization success, embryonic development and offspring survival. Particularly, multiple paternity has been found in the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*), between 25% and 92% in clutches from different beaches, both solitary nesting and arribada beaches, without conclusive results regarding benefits for the offspring. For this reason, the aim of this study was to evaluate the effect of multiple paternity in olive ridley turtle hatchlings. Genomic DNA was obtained from a total of 282 samples, (10 adult females, 237 offspring and 35 randomly selected replicas), collected during the 2016-2017 nesting season in Playa de Escobilla, from the arribadas of the months of September and November of 2016 and February, 2017. Five microsatellites were amplified to assess, the relationship between multiple paternity and hatchling success of the clutches along with the relative condition index (ICr) of the offspring. Multiple paternity was detected in 60% of the analyzed clutches, with a maximum estimation of nine parents and a minimum of two. An inversely proportional relationship was found between multiple paternity and hatchling success, and no relationship was found between multiple paternity and the the ICr of the offspring, although the nest with six fathers had the highest ICr values, this may suggest that there is an optimal number of parents for the hatchlings to reach the highest weights and sizes, but it would be necessary to analyze a mayor number of nests with different levels of multiple paternity to corroborate this trend.

Key words: Polyandry, olive ridley, microsatellites, arribada, Mexican Pacific.



A mi abuelito.

Sé que donde quiera que te encuentres, me miras orgulloso.



Agradecimientos

Mi vida siempre ha estado rodeada de numerosas variables, el tiempo, la distancia, las personas, los lugares, pero siempre hay una constante que me ha acompañado a lo largo del camino y es mi mamá, gracias por siempre estar a mi lado, por ser mi guía, mi fuerza, mi ejemplo, mi motor y mi luz, porque sin ti, yo no sería nada de lo que soy ahora, esto es por ti y para ti, TE AMO.

También agradezco a mis hermanos, que siempre han estado para ser mis compañeros y cómplices, los quiero y siempre estaremos juntos, ¡en el infinito y más allá!

Gracias a mi Dado por construir los pilares que me han dirigido hasta aquí, por todo el apoyo que siempre me diste y por creer en mí, este logro también es tuyo.

Chagüita, tú y mi abuelito guiaron mis primeros años escolares, mira lo lejos que he llegado, gracias por todo tu cariño y amor.

Igualmente un agradecimiento para mis directoras de tesis, la Dra. Valentina Islas Villanueva, por la confianza, la paciencia, el apoyo, las pláticas y los consejos, siempre estaré agradecida por todo lo que hizo por mí y a la M. en C. Samantha G. Karam Martínez, por compartirme su amor a las tortugas y su conocimiento para adentrarme en ese desconocido y maravilloso mundo, siempre te lo voy a agradecer Sam.

Asimismo, a mis revisores, la Dra. Elizabeth Labastida Estrada, gracias por tus recomendaciones, tu tiempo y amistad, al Dr. Felipe Becerril Morales y a la Dra. Tania Zúñiga Marroquín, por su apoyo y sugerencias, por impulsarme a ser una mejor investigadora.

Igualmente al M. en C. Alberto Montoya Márquez por guiarme y ayudarme en la realización de la parte estadística de este proyecto.

Reitero mi agradecimiento a todo el personal del Centro Mexicano de la Tortuga por el apoyo recibido para la toma de muestras, así como a Fernando Flores, Felipe Franco, Paula García, Marisol Lugo, Jessica Ponce, Raúl Ramírez y a todos los voluntarios.

Agradezco también al Dr. Karl P. Phillips, por su tiempo y atención para resolver mis dudas.

Dulce Gonzaga Mendoza y Mónica Jheovanny Aquino, gracias por su participación y apoyo para el desarrollo de la parte metodológica.

Finalmente agradezco a mis compañeros y amigos Aldo, Mafer, Luis, Shan, Mago, Ale, Nati, Wally y Chava, por acompañarme en el camino.



Reconocimiento

Esta tesis fue desarrollada como parte del proyecto institucional CUP 2IR1516: Efecto de la paternidad múltiple y la diversidad morfométrica y genética en la calidad de las crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la Escobilla, Oaxaca, con financiamiento de la Universidad del Mar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca No. 636773 para realizar mis estudios de posgrado.



Índice	Página
1. Introducción	1
1.1 <i>Paternidad múltiple</i>	2
1.2 <i>Tortuga golfina</i>	3
1.3 <i>Determinación molecular de la paternidad múltiple</i>	6
2. Antecedentes	8
3. Justificación	11
4. Pregunta de investigación e hipótesis	11
5. Objetivos	12
5.1 <i>General</i>	12
5.2 <i>Específicos</i>	12
6. Material y métodos	12
6.1 <i>Área de estudio</i>	12
6.2 <i>Colecta de muestras</i>	13
6.3 <i>Extracción de DNA</i>	14
6.4 <i>Amplificación de microsatélites</i>	16
6.5 <i>Análisis de datos</i>	18
6.5.1 <i>Control de calidad y estadísticos de diversidad genética</i>	18
6.5.2 <i>Paternidad múltiple</i>	19
6.5.3 <i>Índice de condición relativo y éxito de eclosión</i>	19
6.6 <i>Análisis estadístico</i>	19
7. Resultados	20
7.1 <i>Obtención y calidad de DNA genómico</i>	20
7.2 <i>Análisis de microsatélites</i>	21
7.2.1 <i>Análisis poblacional</i>	22
7.2.2 <i>Reconstrucción de genotipos paternos y asignación de paternidad</i>	23
7.3 <i>Análisis estadísticos</i>	25
8. Discusión	31
8.1 <i>Amplificación de los microsatélites</i>	31



8.2 Paternidad múltiple.....	32
8.3 Factores que influyen en la paternidad múltiple en tortugas marinas.....	33
8.4 Paternidad múltiple e índice de condición relativo.....	37
8.5 Paternidad múltiple y éxito de eclosión	40
9. Conclusiones	42
10. Referencias	43
11. Anexos.....	51

Índice de figuras	Página
1. Ubicación del área de estudio	13
2. Muestras de DNA genómico.....	21
3. Padres reconstruidos para cada nido	24
4. Correlación de la paternidad múltiple con el ICr	27
5. Correlación de la paternidad múltiple con el éxito de eclosión	28
6. Índice de condición relativo de las crías	29
7. Índice de condición relativo con respecto al grado de paternidad múltiple	31
8. Variación de la media del número de padres con respecto a la arribada	52
9. Variación de la media del ICr con respecto a la temperatura de incubación	52
10. Variación de la media del ICr con respecto a la puesta.....	53



Índice de tablas	Página
I. Secuencia de iniciadores empleados	17
II. Muestras de hembras y crías procesadas para los análisis de PM	21
III. Intervalos de tamaño en pares de bases para cada locus.....	22
IV. Tabla de variación genética por locus.....	23
V. Resultados de PM obtenidos con el software COLONY	25
VI. Promedios de tallas, peso, ICr y éxito de eclosión.....	26
VII. Resultados del análisis PERMANOVA.....	30

Índice de anexos	Página
I. Frecuencias alélicas obtenidas.....	51
II. Variación de la media del número de padres con respecto a la arribada, del ICr con respecto a la puesta y del ICr con respecto a la temperatura de incubación	52
III. Variación y valores promedio del largo, peso y área del caparazón según el número de padres, acorde a los resultados del análisis de PERMANOVA	54
IV. Número de huevos incubados por nido.....	57
V. Porcentaje de fecundación de cada macho	57
VI. Correlación del promedio de temperatura de incubación con el éxito de eclosión...	58
VII. Permisos de colecta.....	59



1. Introducción

Diferentes especies muestran diversos sistemas de apareamiento que van desde la monogamia (una sola pareja en un periodo reproductivo), la poliandria (varios machos en un periodo reproductivo), la poliginia (varias hembras en un periodo reproductivo), hasta la poliginandria (varios machos y hembras se aparean sin crear un vínculo continuo durante el periodo de reproducción) (Davies & Lundberg 1984).

Una de las consecuencias de la poliandria es la paternidad múltiple, que puede llevarse a cabo de dos maneras, apareándose con varios machos durante el mismo ciclo reproductivo o haciendo uso del esperma almacenado (Uller & Olsson 2008).

La paternidad múltiple ha sido comprobada en todas las especies de tortugas marinas (Lee *et al.* 2018), aunque todavía se desconoce qué ventaja evolutiva provee a la descendencia (Alfaro-Núñez *et al.* 2015, Howe *et al.* 2018). Se ha sugerido que la paternidad múltiple tiene beneficios en la adquisición de buenos genes y en el incremento de la diversidad genética, lo que podría provocar mayor éxito en la fertilización, así como un mejor desarrollo y mayor éxito en la supervivencia de las crías, pero hacen falta más estudios que permitan comprobar estos supuestos (Yasui 1998). En los trabajos que han abordado las posibles ventajas de la paternidad múltiple en algunas especies de tortugas marinas como la caguama, Carey y Verde, no se ha encontrado relación entre la paternidad múltiple y el éxito de emergencia, largo, peso, la velocidad de desplazamiento de las crías (Alfaro-Núñez *et al.* 2015), el tamaño de la nidada, el éxito de eclosión o la frecuencia de huevos infértiles (González-Garza *et al.* 2015). También existe evidencia de que el tamaño de la hembra puede influir en el número de padres que fecundan las nidadas, ya que las hembras más grandes, son consideradas las hembras más experimentadas y pueden ser las que se aparean con mayor frecuencia, también se ha sugerido que podría existir una relación positiva entre el número de machos y el éxito de eclosión (Zbinden *et al.* 2007) así como para el desarrollo de los embriones (Howe *et al.* 2018).

Estudios recientes han sugerido, que el almacenamiento espermático en las tortugas marinas podría tener efectos sobre el grado de paternidad múltiple, porque aunque no se han encontrado diferencias en el esfuerzo reproductivo de las hembras entre temporadas, se observó que en la última nidada de la segunda temporada de anidación



de una hembra remigrante, 66% de los huevos no se desarrollaron, lo que podría indicar una disminución de la calidad y la cantidad de espermatozoides (Phillips *et al.* 2014).

En particular, en la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*, Eschscholtz, 1829), se ha encontrado entre el 25% y el 92% de paternidad múltiple en las nidadas de diferentes playas de anidación solitaria y de arribada en el continente americano (Hoekert *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2006), sin que se hayan encontrado implicaciones positivas en la descendencia.

El presente estudio tuvo como finalidad, aportar conocimiento sobre las posibles ventajas de la paternidad múltiple en la tortuga golfina.

1.1 Paternidad múltiple

El comportamiento de apareamiento no es igual para todas las especies, en algunas especies está demostrado que la disponibilidad de gametos a fertilizar está en función de la cantidad de machos disponibles para fecundarlos, esto implica también la participación en el cuidado parental y el aseguramiento del éxito reproductivo (Berglund *et al.* 1989).

Este comportamiento de apareamiento también está regulado por la manera en que algunos organismos escogen a sus parejas sexuales, que puede ser por tamaños o por colores y también algunos otros lo hacen siguiendo estrategias de acuerdo al ambiente en el que se desarrollan. Dentro de estas estrategias de apareamiento encontramos la poliandria en la cual, las hembras se aparean con diferentes machos para la fertilización de los gametos (Alcock 1984).

En organismos que se encuentran en un entorno con patrones de cambio ambiental estables, después de copular, la hembra puede discriminar el apareamiento con machos que puedan heredar características que no permitan la supervivencia de las crías, ya que estas características se pueden volver predecibles. En organismos que están sujetos a cambios ambientales inestables, las hembras pueden adoptar un comportamiento de apareamiento que optimice la adquisición de buenos genes, y así, provocar que la hembra se aparee con diferentes machos (poliandria; Yasui 1998). La poliandria puede proveer beneficios genéticos al incrementar la diversidad genética en las crías y, en consecuencia, esto generará efectos positivos en la supervivencia, el desempeño de la descendencia y la reducción de riesgo de enfermedades (Thonhauser



et al. 2014). Lo que se tendría que considerar, es si este apareamiento múltiple no traería consigo desventajas como una competencia fuerte entre hermanos más que entre medios hermanos, ya que los primeros tendrían características similares para aprovechar los recursos que tienen disponibles para su desarrollo (Yasui 1998) .

En el caso de algunas aves se cree que las hembras recurren al apareamiento múltiple para asegurar la fertilización de sus huevos, ya que este proceso se lleva en un periodo de tiempo relativamente corto y tienen a su disposición una mayor cantidad de semen almacenado, a diferencia de las hembras que se aparean únicamente con un macho. En las aves, se ha observado un mejor desarrollo de las crías producto del apareamiento múltiple (Davies 1983).

La poliandria es la estrategia de reproducción que utilizan las tortugas marinas, se cree que con esto las hembras aseguran una mayor variabilidad genética en la descendencia, aumentando su “calidad” y obteniendo efectos positivos en el rendimiento y la supervivencia (McLeod & Marshal 2009, Alfaro-Núñez *et al.* 2015).

1.2 Tortuga golfina

El grado de paternidad múltiple, consecuencia de la poliandria, varía entre las especies de tortugas marinas, esto indica que existen diferencias entre los sistemas de apareamiento, la elección de machos sexualmente activos, el almacenamiento espermático y la competencia espermática, aunque también existen diferencias entre poblaciones o entre individuos de una misma población. Esto nos podría indicar que hay un efecto de la abundancia de individuos en estas poblaciones, de las preferencias de las hembras para la elección de machos para el apareamiento o tal vez, de algunas presiones de selección natural. La interacción entre todos estos factores todavía es incierta y no se sabe con exactitud cómo puede afectar el grado de paternidad múltiple que se encuentra en las nidadas de tortugas marinas (Howe *et al.* 2018).

La tortuga golfina es una de las más pequeñas dentro de las especies de tortugas marinas, pertenece al género *Lepidochelys* y es la más abundante de todas las especies de tortugas marinas, pero esto también la hace la más susceptible a ser explotada. Pesa alrededor de 35 kg y es principalmente carnívora, los crustáceos son los que se encuentran mayormente en su dieta (Reichart 1993).



El caparazón de las tortugas golfinas llega a medir de 55 a 75 cm, es redondeado con escudos marginales convexos y dirigidos ligeramente hacia arriba, es color olivo amarillento y tiene cinco escudos centrales y cinco o seis pares de escudos laterales. El plastrón presenta un poro en cada uno de los escudos inframarginales (Abreu-Grobois 1999).

En México se estableció una veda total y permanente para la tortuga golfina en 1990, lo que provocó una recuperación notable en el número de anidaciones anuales para el Pacífico mexicano. Actualmente de acuerdo a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), es una especie que se encuentra en estado vulnerable (Abreu-Grobois & Plotkin 2008), y con respecto a la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, es una especie que se encuentra en peligro de extinción, esto debido a la disminución de la densidad que se observó en el periodo de 1977 a 1988 en Playa de Escobilla, Oaxaca, la cual es la principal playa de anidación masiva en México. Gracias a esta medida, las últimas temporadas indican incrementos en el número de anidaciones estimadas, al menos en las costas mexicanas (Peralta & Luna 2016).

La tortuga golfina ocupa varios tipos de hábitats y amplias zonas geográficas en las diferentes fases de su ciclo de vida, estando expuesta a varias amenazas. Entre estas se encuentran la degradación y transformación del hábitat, la cosecha de huevos, la captura directa de adultos, la captura incidental en las pesquerías, el cambio climático, la contaminación marina y la depredación (Varo-Cruz *et al.* 2015).

El apareamiento de la tortuga golfina se lleva a cabo en el océano, por lo general frente a las playas de anidación antes y durante la temporada reproductiva, el número promedio de huevos por nido es de 105. La hembra puede almacenar el espermatozoides del macho y utilizarlo a lo largo de la temporada de apareamiento (Miller 2000). La anidación se puede presentar en zonas de arribada o anidación masiva, que corresponde a un evento en el que miles de hembras llegan a desovar de manera sincronizada abarcando una porción definida de la playa, esta puede durar unas horas, días o incluso semanas, el promedio de arribadas por año es de nueve y, dependiendo de la densidad de la arribada, el número de nidadas va desde 574 hasta 522,000 (Peralta & Luna 2016). La anidación se presenta principalmente de junio a diciembre, y una hembra puede



ovopositar de dos a seis veces por temporada. Las crías concluyen su desarrollo embrionario entre los 45-51 días después de la puesta (CONANP 2008). Un método para evaluar el éxito de la incubación es el cálculo del éxito de eclosión, el cual es un indicador del reclutamiento de las poblaciones, este se obtiene mediante la división del número de crías que eclosionan o rompen su cascarón (o el número de cascarones vacíos en el nido) entre el número total de huevos, representado como proporción o porcentaje (Miller 2000).

Un parámetro que se usa con frecuencia en el estudio de las poblaciones es el índice de condición, que fue estimado por primera vez en peces, el cual es usado para comparar la condición, el peso y el bienestar de los organismos, asumiendo que los organismos más pesados y grandes están en mejor condición, aunque este factor muestra valores diferentes entre temporadas, poblaciones o las condiciones ambientales en las que se encuentren los organismos a analizar (Froese 2006). En tortugas marinas, el índice de condición expresa la relación entre el peso y el largo recto del caparazón, este índice puede ser un indicador del estado de la alimentación de los organismos, pudiendo asociarse al estado de salud de la tortuga (Bjorndal *et al.* 2000).

El índice de condición relativo (ICr) (Le Cren 1951) nos permite agrupar individuos de acuerdo a su apariencia física (≤ 1 : tamaño pequeño; $= 1$: tamaño ideal; ≥ 1 : tamaño alto), y esto permite analizar mejor la variación en el peso y el tamaño de las crías (Labrada-Martagón *et al.* 2010).

Uno de los principales factores que afectan no solo el éxito de eclosión, sino la morfología y por lo tanto el desempeño locomotor, es la temperatura de incubación. Se ha observado que las crías que están expuestas a temperaturas intermedias de incubación (alrededor de 30°C), muestran un mejor desarrollo embrionario y un alto éxito de eclosión que resulta no solo en crías más grandes y con una baja tasa de mortalidad, sino también en crías con un mejor desempeño (Mueller *et al.* 2019).

Actualmente, hay preocupación sobre el efecto que el cambio climático puede tener en las tortugas marinas, ya que la determinación del sexo de las crías depende de la temperatura de incubación: a temperaturas más cálidas la proporción de hembras aumenta (Jensen *et al.* 2018). La temperatura de incubación también puede repercutir en el desarrollo de los embriones, el tamaño de las crías, el desempeño locomotor y el éxito



de emergencia. Con respecto a la tortuga golfina, se sabe que la incubación de nidos arriba de 34°C por al menos tres días consecutivos, afecta negativamente al éxito de emergencia y el desempeño locomotor de las crías (Maulany *et al.* 2012). Existe la predicción de que en 2100 la temperatura global se incrementará en 2.6°C, por lo que varias poblaciones de tortugas marinas se encuentran en riesgo de producir únicamente hembras (Jensen *et al.* 2018), lo que impactará en los sistemas de apareamiento, en la incidencia de paternidad múltiple y las ventajas que esto conlleva.

1.3 Determinación molecular de la paternidad múltiple

Las herramientas moleculares nos permiten entender los fenómenos naturales desde diferentes puntos de vista, estos análisis se basan en la diferencia principalmente entre moléculas de DNA. Actualmente se encuentran varias técnicas que se han desarrollado y nos permiten analizar diferentes aspectos ecológicos y evolutivos como la diversidad genética, paternidad y parentesco, sistemas de apareamiento, conducta animal, adaptación y especiación (Cornejo *et al.* 2014).

Uno de los marcadores moleculares que nos permiten determinar relaciones de parentesco son los microsatélites, que son secuencias de DNA constituidas por motivos repetidos de una a seis pares de bases (pb), las cuales se caracterizan por presentar altas tasas de mutación por lo que son altamente polimórficos, se pueden clasificar en mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos o hexanucleótidos, dependiendo del número de nucleótidos repetidos (Vázquez & Morales 2014).

La identificación de alelos para estudios parentales, se realiza de acuerdo al largo de la secuencia, que está dado por el número de motivos repetidos, el genotipo de los individuos se determina de acuerdo a las diferencias alélicas de muchos loci, y la interpretación de estos análisis está fundamentada en las bases de la herencia mendeliana, es por ello que el estudio de la poliandria se puede hacer de manera efectiva con el análisis de microsatélites (FitzSimmons 1996). Los microsatélites mono y dinucleótidos son más abundantes y tienen una tasa de mutación mayor a diferencia de los microsatélites que tienen de tres a seis repeticiones, los cuales tienen menor variabilidad y menor tasa de mutación, esto hace a los microsatélites herramientas



moleculares adecuadas para detectar diferencias entre individuos de una misma población, para asignación de paternidad y para estudiar la variación entre poblaciones o especies (Vázquez & Morales 2014).

Para el análisis de microsatélites se emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es una técnica que sintetiza un fragmento de DNA mediante una polimerasa a altas temperaturas. La función de la PCR es duplicar un fragmento de DNA de la misma manera que lo hace una célula, para esto es necesaria la presencia de una muestra de DNA molde, de la polimerasa, los primers (cebadores o iniciadores) para que se lleve a cabo la replicación, la presencia de dideoxiribonucleósidos trifosfato (ddNTPs), y mantener a determinado pH la muestra junto con la presencia de sales u otros reactivos (Asuar 2007).

La PCR consiste en la desnaturalización del DNA, proceso mediante el cual los puentes de hidrógeno de la molécula se rompen y así se logra la separación de la doble cadena, los iniciadores se adherirán a los sitios de reconocimiento dentro de la cadena sencilla de DNA delimitando la región que se va a amplificar, por último se sintetiza una nueva cadena de DNA que posteriormente se unirá a la cadena vieja, para formar una nueva cadena de DNA, este proceso de desnaturalización, alineamiento y extensión se repetirá originando millones de copias del sitio amplificado (Díaz *et al.* 2014). Los fragmentos amplificados pueden ser visualizados mediante electroforesis, que consiste en el movimiento o desplazamiento diferencial de ciertas sustancias, por migración pasiva, atracción o repulsión en un campo eléctrico (Castagnino 2000). Existe la electroforesis en geles de agarosa, geles de poliacrilamida o por capilares en secuenciadores automáticos.

Esta última es una técnica de separación basada en la migración de los componentes de la muestra sujetas a un campo eléctrico a través de un capilar de aproximadamente 50 μ m, en donde los fluoróforos acoplados al fragmento de PCR amplificado serán detectados por un láser que los excita a diferentes longitudes de onda, permitiendo la visualización de los fragmentos amplificados y esto hace que el proceso sea más rápido y preciso (Magaña *et al.* 2009). Para esta técnica son necesarios iniciadores marcados con fluorescencia, pero estos pueden ser bastante costosos. Una manera de reducir los costos de los iniciadores es emplear aquellos que tengan una



secuencia extra (modificación) o sonda que les permita ser individuales y no una secuencia específica (como en el caso de los iniciadores). De esta manera se podría aplicar un sistema de tres iniciadores, comúnmente un iniciador forward con una modificación en el extremo 5', un iniciador reverse y un iniciador universal con fluoróforo en el extremo 5'. De esta manera, mediante las condiciones de la PCR el iniciador forward con la secuencia extra se incorpora a los productos de la PCR, cuando este iniciador se consume, el iniciador universal se adhiere a los otros e incorpora la fluorescencia (Schuelke 2000). El iniciador que tiene la marca fluorescente puede utilizarse con cualquier otro iniciador que cuente con la modificación universal para su análisis (Boutin-Ganache *et al.* 2001).

2. Antecedentes

Existen pocos análisis de paternidad múltiple en tortugas golfinas, se tiene registro de cinco estudios en los que se determinó el porcentaje de paternidad múltiple, tres de estos fueron realizados en diferentes playas de anidación solitaria, en las cuales se reportan porcentajes de paternidad múltiple de 25% en Galibli, Suriname (Hoekert *et al.* 2002), 30% en Playa Hermosa, Costa Rica (Jensen *et al.* 2006) y 75% en Punta Ratón y Punta Venado, Honduras (Duran *et al.* 2015); los otros dos estudios se llevaron a cabo en playas de arribada, reportando un porcentaje de paternidad múltiple de 50% en Playa de Escobilla, México (Villegas-Zurita 2008) y 92% en Ostional, Costa Rica (Jensen *et al.* 2006).

Jensen *et al.* (2006) colectaron muestras de dos localidades de Costa Rica: Ostional que es una playa de arribada y de Playa Hermosa que es una playa de anidación solitaria. Los autores plantearon una correlación entre la incidencia de la paternidad múltiple con el tamaño de la colonia, siendo mayor la incidencia de paternidad múltiple en playas de arribada, analizaron seis microsátélites para la asignación de paternidad en 26 nidos y 581 crías de tortuga golfina, encontraron 92% de paternidad múltiple en Ostional, que es una playa con mayor abundancia de hembras anidadoras a diferencia de Playa Hermosa en donde encontraron solo 30% de incidencia.

Villegas-Zurita (2008) determinó la frecuencia de paternidad múltiple en tortuga golfina de Playa de Escobilla, en el estado de Oaxaca, México. Utilizando dos loci de



microsatélite encontró paternidad múltiple en un 50% de las familias analizadas (319 crías y 16 madres), se identificaron entre dos y cinco padres en las nidadas analizadas y no encontró influencia del número de padres sobre el porcentaje de eclosión.

Turkozan *et al.* (2019) investigaron la incidencia de paternidad múltiple en la playa de Akyatan, en Turquía, en donde se encuentra la colonia más grande de tortuga verde (*Chelonia mydas*, Linnaeus, 1758) del Mediterráneo utilizando nueve microsatélites, en 22 nidos y 330 crías, encontraron una incidencia del 63.6% de paternidad múltiple en la colonia y un promedio de tres padres por nidada. Cabe resaltar que es el primer estudio que reporta diez padres involucrados en la fecundación de una nidada, es el número más alto de padres encontrado en tortugas marinas hasta el momento.

Zbinden *et al.* (2007) examinaron la frecuencia de paternidad múltiple en una colonia de tortuga caguama (*Caretta caretta*, Linnaeus, 1758) del Mediterráneo, trataron de relacionar el número de padres con el tamaño de la hembra y el éxito de eclosión de las crías. Tomaron en cuenta 571 crías provenientes de 15 nidos, para la asignación de paternidad utilizaron cuatro microsatélites. Encontraron una correlación positiva entre el número de padres con el tamaño de la hembra y con el éxito de eclosión, sugiriendo que el tamaño de la hembra está relacionado con la frecuencia de apareamiento, ya que los machos tienen preferencia por las hembras más grandes, y también al ser hembras con mayor madurez sexual pueden producir huevos de mejor calidad y elegir los mejores sitios de anidación.

Alfaro-Núñez *et al.* (2015), analizaron los efectos de la poliandria y el número de padres involucrados en los rasgos morfológicos y de supervivencia de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) en Tortuguero, Costa Rica, encontrando un 92% de paternidad múltiple en 530 crías provenientes de 12 nidos, con la intervención de tres padres por nido en promedio. Los autores sugieren dos enfoques para la evaluación de los efectos de la paternidad múltiple en los rasgos morfológicos: primero, los nidos con el mismo número de padres; y segundo, los nidos con la misma contribución parental (padres que contribuyan con la mayor proporción de crías). Con respecto a los nidos con el mismo número de padres, encontraron valores mayores en el largo y el peso de las crías provenientes de nidos con dos o tres padres, mientras que las crías de los nidos con la



misma contribución parental no presentaron diferencias significativas en los rasgos morfológicos.

González-Garza *et al.* (2015) realizaron un estudio en la Península de Yucatán en México, en seis colonias de anidación de tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*, Linnaeus, 1766), analizaron 12 loci de microsatélites en 1,195 crías de 50 nidos para evaluar los niveles de paternidad múltiple, la variación genética y la relación de los niveles individuales de homocigosidad con el éxito reproductivo (tamaño de la nidada, éxito de eclosión y porcentaje de huevos sin fertilizar). De los 50 nidos analizados, solo el 6% presentó paternidad múltiple, uno de los porcentajes más bajos encontrados para esta especie. Estimaron que los nidos con paternidad múltiple fueron fecundados por un máximo de tres padres, con un macho dominante en cada nido. La variación genética fue similar entre colonias, lo que sugiere la existencia de filopatría. No encontraron evidencia de que la variabilidad genética estuviera asociada a diferencias en el éxito reproductivo, sin embargo, encontraron que las hembras remigrantes tuvieron una mayor diversidad genética a diferencia de las tortugas neófitas, lo que podría suponer una pérdida de variación genética. No encontraron una relación entre la homocigosidad y el tamaño de la nidada, el éxito de eclosión o el porcentaje de huevos sin fertilizar, lo que podría indicar que la diversidad genética que hay en las colonias de la Península de Yucatán, no afecta el éxito reproductivo.

Phillips *et al.* (2017) analizaron la forma en que la variabilidad genética individual se relaciona con el tamaño de la nidada y el éxito del huevo (éxito de eclosión, éxito de emergencia y éxito de fertilización), en nidadas de tortuga Carey de la República de Seychelles. Para la correlación del tamaño de la nidada, tomaron en cuenta la heterocigosidad materna y para el éxito del huevo, consideraron la heterocigosidad paterna y el parentesco obtenidos de 32 microsatélites. No encontraron efectos de la heterocigosidad materna sobre el tamaño de la nidada o el éxito de los huevos. Sin embargo, encontraron efectos de la heterocigosidad paterna y el parentesco, en el éxito del huevo: en niveles bajos a intermedios de heterocigosidad paterna, el parentesco se incrementó y afectó de manera negativa al éxito del huevo; al contrario, cuando la heterocigosidad paterna aumentó, el parentesco desapareció y se dio un efecto positivo en el éxito del huevo.



Howe *et al.* (2018) determinaron si el grado de paternidad múltiple en las nidadas de tortuga caguama, presentaba relación con el tamaño del cuerpo de las hembras o con la experiencia de apareamiento y cómo esto influye en la fertilización y el éxito de eclosión de las crías. En total analizaron 29 nidos y 552 crías con seis microsatélites, encontraron 65.5% de incidencia de paternidad múltiple, no encontraron una relación entre la paternidad múltiple y la talla de las hembras o la experiencia de apareamiento, ya que se presentó la misma incidencia entre hembras experimentadas y hembras neófitas; sin embargo, encontraron que en nidadas con paternidad múltiple de hembras experimentadas había un mayor grado de paternidad múltiple. No encontraron relación entre la paternidad múltiple y el número de crías por nidada, las variaciones morfológicas dentro del nido o el éxito de eclosión, aunque el número de machos sí influyó en la proporción de embriones desarrollados, sugiriendo una aptitud ventajosa de la paternidad múltiple.

3. Justificación

Probablemente la selección natural ha favorecido la paternidad múltiple en las tortugas marinas porque conlleva ventajas para las crías en su adecuación biológica y supervivencia, es importante realizar estudios que nos permitan evaluar si la existencia de paternidad múltiple tiene efectos positivos en el éxito de eclosión de las nidadas y/o en el índice de condición de las crías, esto nos permitirá ampliar las acciones que se pueden tomar para el manejo y conservación de estos organismos.

4. Pregunta de investigación e hipótesis

- 🐢 ¿Cuál es la relación que existe entre la paternidad múltiple con el éxito de eclosión de las nidadas y el índice de condición relativo de las crías?

La poliandria (expresada en paternidad múltiple) es un sistema de apareamiento ventajoso que adoptan las hembras de *L. olivacea*, en Playa de Escobilla, Oaxaca.

Predicción 1: las nidadas que presenten un mayor número de padres tendrán un mayor éxito de eclosión.



Predicción 2: las crías que provengan de nidadas con un mayor número de padres, tendrán un mejor índice de condición relativo.

5. Objetivos

5.1 General

Analizar el efecto de la paternidad múltiple en el éxito de eclosión de las nidadas y el índice de condición relativo de las crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Playa de Escobilla, Oaxaca, México.

5.2 Específicos

- ✦ Confirmar la presencia de la paternidad múltiple en 10 nidos de tortuga golfina de Playa de Escobilla, Oaxaca, mediante el uso de microsatélites.
- ✦ Determinar los genotipos paternos a partir de los datos genéticos obtenidos de las hembras y de las crías mediante el uso de microsatélites.
- ✦ Evaluar la relación entre el número de padres y el éxito de eclosión de las nidadas.
- ✦ Evaluar la relación entre el número de padres y el índice de condición relativo de las crías.

6. Material y métodos

6.1 Área de estudio

La Playa de Escobilla se localiza en terrenos comunales de San Francisco Cozoaltepec y Santa María Tonameca, ambos en el municipio de Santa María Tonameca, distrito de Pochutla, estado de Oaxaca. Tiene una longitud de 25 km y una anchura de hasta 20 m, abarcando 615 km² en su totalidad, correspondiendo a una franja de 8 km a la zona de anidación, en donde se encuentra un campamento tortuguero localizado en las coordenadas 15°43'66" latitud N y 96°45'67" longitud O, con un acceso situado a la altura del kilómetro 180.5 de la carretera federal No. 200, entre las poblaciones de Puerto Escondido y Pochutla. La playa se encuentra limitada al oeste por Barra de Potrero (río Cozoaltepec) y al este por Barra de Tilapia (Arriaga *et al.* 1998; Figura 1).



La zona de anidación es considerada una zona de arribada o anidación masiva, además es un área natural protegida con categoría de santuario (Santuario Playa de Escobilla) y es administrada por el Centro Mexicano de la Tortuga (CMT) de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) (Lobato 2015).

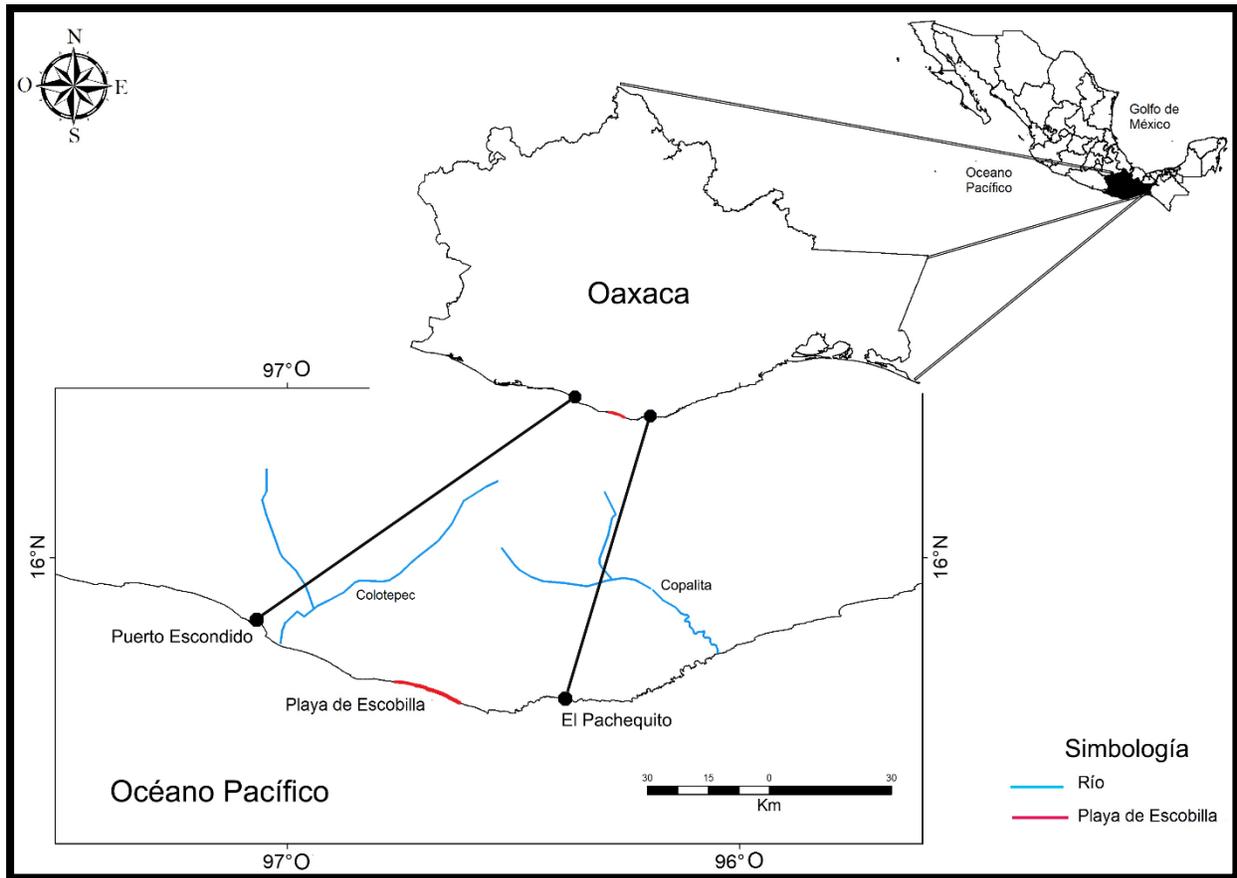


Figura 1. Ubicación del área de estudio, Playa de Escobilla en la costa de Oaxaca.

6.2 Colecta de muestras

El presente trabajo se llevó a cabo a partir de una colección de muestras de hembras anadoras y sus crías (de 20 a 25 crías de cada nidada), así como de datos de temperatura de incubación y morfometría que fueron tomados en la temporada de anidación 2016-2017 en el Santuario de Playa de Escobilla, en Santa María Tonameca, Oaxaca. Se realizaron tres visitas: la primera arribada muestreada fue en el mes de



septiembre de 2016, la segunda en noviembre del mismo año y la tercera en febrero de 2017.

En cada visita se seleccionaron cinco hembras al azar, pero para el efecto del presente estudio solo se usaron las muestras de diez hembras anidadoras y de sus crías. En cuanto una hembra comenzaba a desovar, se marcó con una grapa metálica tipo Inconel, se recolectaron los huevos directamente de la cloaca en una bolsa plástica, al terminar de ovopositar, se le extrajo una muestra de 0.5-1.0 ml de sangre del seno cervical dorsal, o bien, una muestra de piel obtenida de la aleta. Las muestras fueron colectadas y preservadas en 5 ml de etanol absoluto de acuerdo con la técnica descrita por Dutton (1996). Posteriormente, los huevos de cada nidada fueron contados e incubados en cubetas con arena de la playa, en cada nidada se colocó un dispositivo para el registro de la temperatura de incubación; finalmente, las cubetas se trasladaron a una habitación cerrada en el CMT hasta el momento de la emergencia de las crías.

Tras el periodo de incubación (45 días aproximadamente) se contaron las crías emergidas y se seleccionaron de 20 a 25 individuos al azar ($n=237$). Todos los individuos seleccionados fueron pesados con una balanza digital, se obtuvo el largo curvo del caparazón (LCC) con una cinta métrica y posteriormente, se les cortó una pequeña muesca del borde del caparazón con ayuda de un alicate esterilizado de acuerdo al método descrito por González-Garza *et al.* (2016), el tejido fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 ml con etanol absoluto y mantenido en congelación en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel.

Todas las actividades de manejo, captura, marcado y obtención de muestras realizadas fueron autorizadas por la Dirección de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (DGVS-SEMARNAT) mediante los permisos de colecta Oficio No. SGPA/DGVS/09320/16 y Oficio No. SGPA/DGVS04291/16

6.3 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las crías se siguió el protocolo para la extracción del kit Gentra® PureGene® Core Kit A de QIAGEN®, las muestras de caparazón colectadas se maceraron y se colocaron en tubos Eppendorf en un buffer de lisis celular con 1.5 μ l de proteinasa K. Posteriormente la muestra se incubó en baño María a 65°C durante varias



horas, mezclándola ocasionalmente y macerándola con un pistilo hasta que tuviera una consistencia homogénea, si después de algunas horas no se mostraban cambios en el tejido, se adicionaron 1.5 μ l más de proteinasa K. Una vez que el tejido fue digerido completamente, se removió del baño María y se dejó reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente, y se agregaron 1.5 μ l de RNAsa A y se incubó en un termo block a 37°C por 30 minutos.

Consecutivamente la muestra se colocó en hielo durante un minuto, se agregaron 100 μ l de solución de precipitación de proteínas y se mezcló con un agitador tipo vórtex a alta velocidad durante 20 segundos. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante tres minutos. El sobrenadante se extrajo y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 300 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión 50 veces. Si el pellet no era visible, la muestra se colocó a -20°C toda la noche, si el pellet se observaba, se centrifugó inmediatamente a 13,000 rpm durante cinco minutos y posteriormente se colocó en hielo por 15 minutos.

Cuidadosamente se desechó el sobrenadante y el tubo se dejó reposar sobre papel absorbente; cuando los restos de isopropanol se evaporaron, el pellet se lavó con 300 μ l de etanol al 70% mezclando por inversión varias veces. La muestra fue centrifugada nuevamente durante un minuto a 13,000 rpm para remover el sobrenadante y nuevamente se dejó sobre papel absorbente para que el resto del etanol se evaporara.

Se agregaron 50 μ l de solución hidratante de DNA y se agitó en el vórtex a velocidad media, se incubó nuevamente a 65°C por una hora para disolver el DNA, posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche mezclando por inversión constantemente.

Para la extracción de DNA de las muestras de las hembras se siguió el protocolo del kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN®, en el caso de las muestras de aleta de las hembras, se cortaron en pedazos pequeños y fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 180 μ l de Buffer ATL y 20 μ l de proteinasa K, se agitaron en el vórtex durante 15 segundos y se incubaron a 56°C, agitando constantemente para favorecer la degradación del tejido.



Para las muestras de sangre se colocaron 20 μ l de proteinasa K en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 50 μ l de sangre precipitada y se ajustó el volumen final a 220 μ l con PBS.

Cuando la muestra ya mostraba una consistencia homogénea, se añadieron 200 μ l del Buffer AL y se agitaron en el vórtex 15 segundos, después se incubó a 56°C durante 10 minutos. Se agregaron 200 μ l de etanol (96-100%) y se mezcló en el vórtex durante 15 segundos. La muestra fue transferida a una columna de unión colocada dentro de un tubo colector y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto desechando el residuo del tubo colector. Se añadieron 500 μ l del Buffer AW1 en la columna de unión y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm durante un minuto desechando el residuo del tubo colector. Se agregaron 500 μ l del Buffer AW2 en la columna de unión y se centrifugó a 14,000 rpm durante tres minutos desechando nuevamente el residuo.

Se transfirió la columna de unión a un nuevo tubo Eppendorf y se colocaron 50 μ l del Buffer AE en la columna y se dejó a temperatura ambiente durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto. Para obtener una mayor concentración de DNA se colocaron 50 μ l más de Buffer AE en la columna y se volvió a centrifugar a 8,000 rpm durante un minuto.

La integridad y concentración de DNA se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, el cual fue visualizado en un transiluminador con luz ultravioleta marca Life Technology Mod. TFX-20M.

6.4 Amplificación de microsatélites

Para la genotipificación de los individuos, se seleccionaron 11 microsatélites, seis marcados con fluorescencia: OR-1 (Aggarwal *et al.* 2004), OR-20, OR-22, OR-18, OR-11 (Aggarwal *et al.* 2008), Cm84 (FitzSimmons *et al.* 1995), y cinco con una modificación M13 o sonda CAG: CcP2H12, CcP5F01, CcP7C04, CcP1F01 (Shamblin *et al.* 2007, Shamblin *et al.* 2009) y CcP7C08 (Shamblin *et al.* 2009). La secuencia de los iniciadores utilizados se muestra en la Tabla I. La asignación de fluoróforos usados para cada microsatélite se realizó tomando en cuenta el intervalo de tamaños de cada fragmento, procurando que los fragmentos que se superpusieran tuvieran fluorescencias diferentes



para su identificación y tratando de maximizar el número de microsatélites en una sola corrida de PCR y en una sola placa de secuenciación.

Tabla I. Secuencia de iniciadores empleados para amplificar *loci* de microsatélites. Se muestra el fluoróforo empleado y los tamaños esperados. En negritas se muestra la secuencia complementaria en los iniciadores modificados con la sonda CAG.

Locus	Secuencia F	Secuencia R	Referencia	Fluoróforo	Tamaño
OR-1	CCCCTTGTTCTGAAATCCTATGA	CAGGCATAGGGAAAAATCAGAGGTA	Aggarwal et al. 2004	NED	150-202
OR-20	TCACGAACATCAGCAAATTATT	GTCCATCCCCCACCACCA	Aggarwal et al. 2008	VIC	110-124
OR-22	AAGTCCTGTTGAATCCTGCCATAG	GGTTAGATATAGGAGGTGCTGATGTTA	Aggarwal et al. 2008	VIC	217-247
Cm84	TGTTTTGACATTAGTCCAGGATTG	ATTGTTATAGCCTATTGTTCAGGA	FitzSimmons et al. 1995	VIC	325-352
OR-18	AAACACCAGAATAGAGGCTCAAACCT	TCTCTGGGCTGCCTACTTTATTC	Aggarwal et al. 2008	FAM	108-120
OR-11	TGAGCACTGCAAAATGGAGGATGGT	AGTGCCTGATTCCTCAGATTGCTGAG	Aggarwal et al. 2008	FAM	182-242
CcP7C08	CAGTCGGGGCGTCATC AGAGCATTGGCAGCATAGA	GTTTAGTGAGTTCTAAAATGCCAAC	Shamblin et al. 2009	FAM	288-298
CcP2H12	CAGTCGGGGCGTCATC ATCTTCAGGAGTTTTGACTTG	GTTTCCACACCCCTGTTTCAGA	Shamblin et al. 2007 y 2009	FAM	336-388
CcP5F01	GTTTAAAGGATTTGAGATGTTGTATG	CAGTCGGGGCGTCATC ACCAGTTGTCTTTTCCAGTG	Shamblin et al. 2007 y 2009	PET	116-160
CcP7C04	GTTTCTTAACCAACGGAGAAACA	CAGTCGGGGCGTCATC ACTCCTTCAGAAGTCTTCACAT	Shamblin et al. 2007 y 2009	PET	209-265
CcP1F01	CAGTCGGGGCGTCATC AGTGTGAAGGCTCTAAAACATAAT	GTTTATACTGGGACGATAGGATAAA	Shamblin et al. 2007 y 2009	PET	313-385

Se realizaron tres reacciones de amplificación de microsatélites para el conjunto de 11 loci que se analizaron en total.

Primeramente se realizó una reacción de PCR multiplex, para la amplificación simultánea de seis loci de microsatélites marcados con fluorescencia (OR-1, OR-11, OR-18, OR-20, OR-22 y Cm84), con el kit Type-IT Microsatellite de QIAGEN®, en una reacción de 5µl se agregaron 2.5 µl del master mix, 1 µl de mezcla de iniciadores 10X (a 2µM cada iniciador) usando una proporción 1:7:3: (0.28µl de iniciador forward 100µM, 0.4µl iniciador reverse 100µM y 1.2µl de iniciador fluorescente 10µM) con 1.5 µl de DNA molde (~30ng). Para su amplificación se siguieron los perfiles de temperaturas recomendados por el fabricante, la activación inicial de HotStarTaq polimerasa a 95°C por cinco minutos, seguido de 28 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 90 s y 72°C por 30 s, con una extensión final de 60°C por 30 minutos.

A otro grupo de microsatélites se les añadió una sonda CAG en el extremo 5', los cuales son modificados con esta sonda al final de cada iniciador para facilitar la detección de la fluorescencia, se realizaron dos reacciones de PCR multiplex. Una reacción se llevó a cabo agregando el fluoróforo PET para tres microsatélites (CcP5F01, CcP7C04 y CcP1F01) y la segunda con el fluoróforo FAM para dos microsatélites (CcP7C08 y CcP2H12), ambas reacciones se realizaron con el kit Type-IT Microsatellite de QIAGEN®,



en un volumen de 5 μ l en donde se agregaron 2.5 μ l del master mix, 1 μ l de mezcla de iniciadores 10X (a 2 μ M cada iniciador) y 1.5 μ l de DNA molde (~30ng), siguiendo los perfiles de temperaturas de la reacción anterior. Los productos PCR se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Illinois donde se realizó el análisis de fragmentos en secuenciadores automáticos Applied Biosystems 3730xl y un marcador de peso molecular (*standard size*) LIZ 600.

La lectura de los fragmentos fluorescentes para la genotipificación se realizó por medio del programa GeneMarker v. 1.70 (Soft Genetics, State College, PA, USA), estableciendo un umbral de detección de picos de 100 unidades relativas de fluorescencia (URF), todos los picos que se encontraban por debajo de este umbral fueron descartados.

6.5 Análisis de datos

6.5.1 Control de calidad y estadísticos de diversidad genética

El agrupamiento de intervalos de las lecturas de tamaños, para la asignación de los estados de carácter se realizó por medio del programa Allelogram (Morin *et al.* 2009), siguiendo las recomendaciones de control de calidad de Morin *et al.* (2001), se amplificaron al azar el 14% del total de los individuos para calcular el error de genotipificación (n=35), que se obtuvo dividiendo el número de genotipos que presentaban diferentes tamaños de cada réplica entre el total de genotipos obtenidos, también se calculó el porcentaje de loci no amplificados dividiendo el total de loci no amplificados entre el total de genotipos obtenidos, adicionalmente se verificaron errores y presencia de alelos nulos con el software Microchecker v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada y esperada, así como la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, fueron calculadas únicamente con las hembras mediante el programa GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse 2012). La riqueza alélica y el coeficiente de endogamia se estimaron mediante el software FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995).



6.5.2 Paternidad múltiple

La probabilidad de exclusión (probabilidad de excluir a un individuo no emparentado, de la asignación paterna) fue analizada por el programa GERUD 2.0 (Jones 2005).

Para la reconstrucción de los genotipos paternos y la asignación de paternidad de cada una de las crías, se utilizó el software COLONY v2.0.6.5 (Jones & Wang 2010), que emplea el método de máxima verosimilitud en el análisis de pedigrís completos para asignar parentesco y paternidad; cada nido fue analizado como una sola matriz de datos y el software fue programado para actualizar las frecuencias alélicas en tres corridas de media longitud, bajo el principio de máxima verosimilitud con una media precisión de acuerdo a los parámetros propuestos por Phillips *et al.* (2013).

6.5.3 Índice de condición relativo y éxito de eclosión

La relación del peso (kg) con respecto al LCC (cm) de las crías fue estimada mediante la fórmula del índice de condición relativo (ICr), establecida por Le Cren (1951):

$$ICr = \frac{Peso}{a (LCC)^b}$$

en donde a y b son parámetros obtenidos de la relación exponencial entre el peso y el largo curvo del caparazón de las crías.

El éxito de eclosión fue calculado mediante la fórmula establecida por Miller (2000):

$$\text{Éxito de eclosion (\%)} = \left(\frac{\text{cascarones eclosionados}}{\text{huevos sembrados}} \right) \times 100$$

6.6 Análisis estadístico

Los datos fueron agrupados por nidada con las respectivas medidas del índice de condición relativo, el éxito de eclosión y el número de padres involucrados en cada una. El programa STATISTICA v 7.0 (Statsoft) fue utilizado para establecer la correlación de Pearson de la paternidad múltiple con el índice de condición relativo y el éxito de eclosión.



Para determinar si existen diferencias entre los índices de condición relativos y las crías provenientes de diferentes padres dentro de los nidos que presentan paternidad múltiple, se analizó la existencia de diferencias significativas entre las medias del conjunto de variables estudiadas mediante análisis permutacionales de varianza (PERMANOVA), de una sola vía, con el software PRIMER 6 + PERMANOVA (Anderson *et al.* 2008). El análisis PERMANOVA es un procedimiento no paramétrico, que se basa en el análisis de medidas de distancia o diferencias entre observaciones multivariadas individuales, usando permutaciones para obtener una probabilidad asociada a la hipótesis nula de que no hay diferencias entre los grupos (Anderson 2001). Para realizar los PERMANOVA se usó la distancia Euclidiana para construir la matriz de semejanza. Se utilizó un método de permutación de datos crudos sin restricción (Unrestricted, permutation of raw data) con 9999 permutaciones. Se aplicó la suma de cuadrados parcial (Tipo III) y para calcular el valor de p se realizó el test de Monte Carlo, en caso de que el número de permutaciones del análisis sea menor a 100.

7. Resultados

7.1 Obtención y calidad de DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico de un total de 282 muestras, (10 hembras adultas, 237 crías y 35 réplicas seleccionadas al azar; Tabla II) colectadas durante la temporada de anidación del 2016-2017 en Playa de Escobilla, y que corresponden a las arribadas del mes de septiembre, noviembre y febrero. Para todos los individuos se verificó la integridad y calidad del DNA (Figura 2).



Tabla II. Muestras de hembras y crías de tortuga golfina procesadas para los análisis de paternidad múltiple. La arribada uno es del mes de septiembre del 2016, la dos es de noviembre del mismo año y la tres es de febrero del 2017.

Nido	ID Hembra	Arribada	Crías
1	E07	1	24
2	E08	1	24
3	E09	1	18
4	E11	2	25
5	E12	2	25
6	E16	3	24
7	E17	3	25
8	E18	3	25
9	E19	3	23
10	E20	3	24
Total	10		237

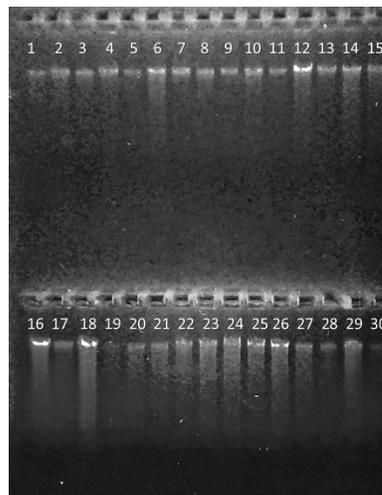


Figura 2. Calidad del DNA genómico extraído con el kit QIAGEN® PUREGENE, observado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

7.2 Análisis de microsatélites

De los 11 microsatélites utilizados, se logró la amplificación de seis marcados con fluorescencia en reacciones de PCR multiplex, estos fueron OR-1, OR-20, OR-22, OR-18, Cm84 y OR-11, los microsatélites con sonda CAG se lograron amplificar en un primer intento de manera individual, pero no en placas.



El análisis de genotipificación con el programa GeneMarker v. 1.70 permitió la asignación de 66 estados de carácter (alelos) para los seis microsatélites, se detectaron individuos homocigotos y heterocigotos, en la Tabla III se muestran los intervalos de tamaños de los alelos encontrados en este estudio.

Tabla III. Intervalos de tamaño en pares de bases (pb) para cada locus encontrado en este estudio donde; n: Número de muestras analizadas; N_a: Número de alelos; Tamaño del alelo en pb (alelo más frecuente entre paréntesis).

Microsatélite	n	N _a	Tamaño (pb)
Cm84	247	13	319-343 (325)
OR-1	247	12	145-197 (149)
OR-11	247	18	192-234 (222)
OR-18	247	5	117-127 (121)
OR-20	247	8	99-121 (115)
OR-22	247	10	217-239 (221)

No se detectó presencia de alelos nulos o bandas tartamudas, el error de genotipificación total de todos los genotipos en todos los loci analizados fue de 0.004, el porcentaje de loci no amplificados fue de 9.31%.

7.2.1 Análisis poblacional

En la submuestra de individuos no relacionados (correspondiente a las 10 hembras), los seis loci fueron polimórficos, identificando entre dos y 14 alelos. La heterocigosidad esperada ($H_e = 0.255$) y observada ($H_o = 0.300$) fue baja para el locus OR-18, mientras que para el locus OR-11 fue alta ($H_e = 0.915$ y $H_o = 1.00$). La desviación del equilibrio Hardy-Weinberg no mostró diferencias significativas, el coeficiente de endogamia reportó valores negativos para cinco loci, excepto para OR-22. La riqueza alélica mostró variación de acuerdo con cada locus y la probabilidad de exclusión para los cinco loci combinados fue de 0.9901 (Tabla IV). Las frecuencias alélicas de los cinco loci fueron basadas en los genotipos de las hembras anidadoras (Anexo I).



Tabla IV. Parámetros genéticos para hembras de tortuga golfina de Playa de Escobilla; *N*: Tamaño de la muestra; *Na*: Número de alelos; *H_o*: Heterocigosidad observada; *H_e*: Heterocigosidad esperada; *HWE*: Significancia de la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (ns= no significativo); *F_{IS}*: Coeficiente de endogamia; *RA*: Riqueza alélica; *PE*: Probabilidad de exclusión.

Locus	N	Na	H _o	H _e	HWE	F _{IS}	RA	PE
OR-18	10	2	0.300	0.255	ns	-0.180	4.968	0.111
OR-11	10	14	1.000	0.915	ns	-0.036	17.814	0.828
OR-20	10	5	0.700	0.745	ns	-0.061	7.814	0.508
OR-22	10	9	0.900	0.800	ns	0.048	9.994	0.625
Cm84	10	10	0.900	0.855	ns	-0.053	13.000	0.715
OR-1	10	8	0.900	0.820	ns	0.006	11.687	0.650

7.2.2 Reconstrucción de genotipos paternos y asignación de paternidad

Se genotipificaron 10 hembras y un total de 206 crías provenientes de sus nidos, con un promedio de 20.5 (± 2.2 DE) crías por nido. Para la reconstrucción de los genotipos paternos y asignación de la paternidad, se excluyó el microsatélite Cm84 debido a tenía 30% del total de los individuos sin amplificar, y los picos se visualizaban por debajo del umbral de detección, así que solo se tomaron en cuenta los individuos que amplificaron exitosamente los cinco microsatélites restantes.

Mediante el análisis con COLONY, se detectó paternidad múltiple en el 60% de los nidos analizados. Se estimaron nueve padres para el nido E08, ocho padres para el nido E07, seis padres para el nido E09, cuatro padres para el nido E12, tres padres para el nido E16, dos padres para el nido E19 y un padre para los nidos E11, E17, E18 y E20 (Figura 3).



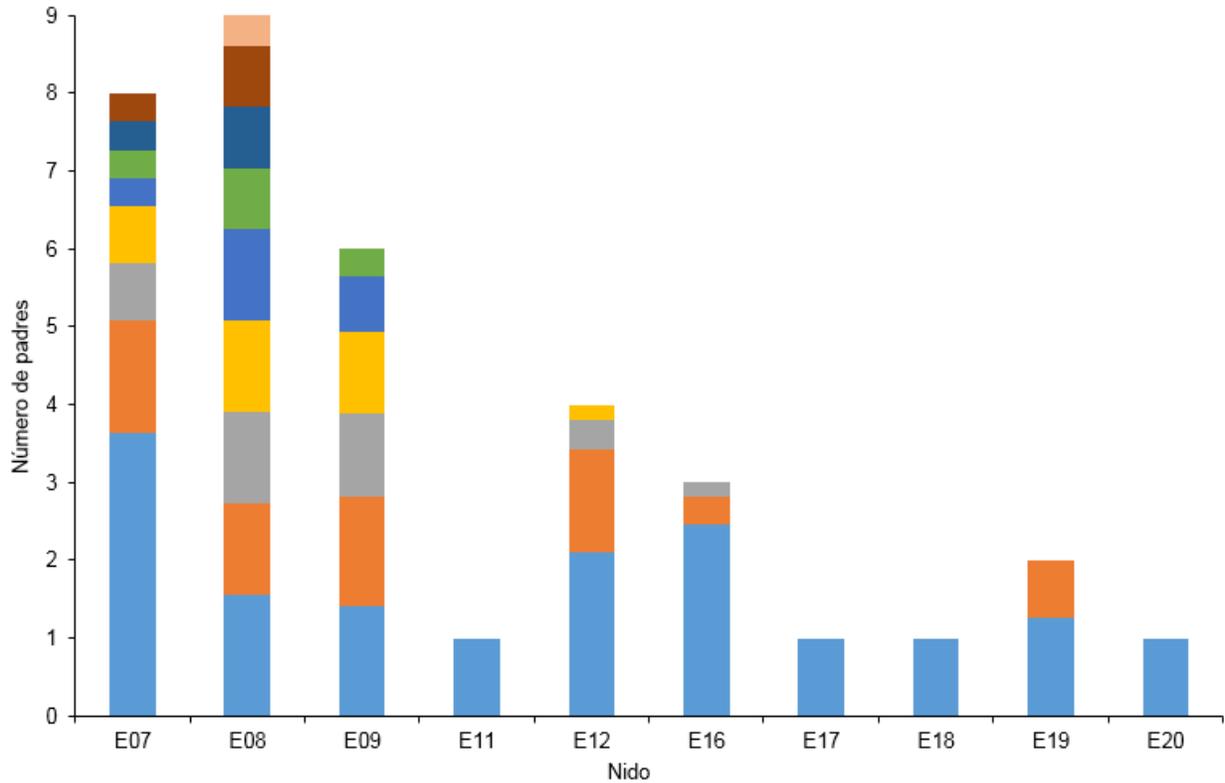


Figura 3. Número de padres identificados en cada nido a través de la reconstrucción de genotipos paternos y su contribución relativa.

Los genotipos de los machos reconstruidos presentaron intervalos de probabilidad ≥ 0.98 y de acuerdo con los estándares de Phillips *et al.* (2013) fueron aptos para la asignación de paternidad. Un total de 36 padres estuvieron presentes repartidos entre los diez nidos, ningún padre fecundando más de un nido (Tabla V).



Tabla V. Resultados de paternidad múltiple obtenidos con el software COLONY; n: Número de crías analizadas por nido.

Hembras	Arribada	n	Machos reconstruidos
E07	1	22	8
E08	1	23	9
E09	1	17	6
E11	2	23	1
E12	2	21	4
E16	3	17	3
E17	3	21	1
E18	3	22	1
E19	3	19	2
E20	3	21	1
Total		206	36

7.3 Análisis estadísticos

En la Tabla VI se muestra el promedio de las medidas, el peso, el ICr y el éxito de eclosión por nido.



Tabla VI. Promedios (\pm DE) del largo curvo del caparazón (LCC), peso, índice de condición relativo (ICr) y el éxito de eclosión por nido.

Nido	Arribada	Número de padres	LCC (cm)	Peso (kg)	ICr	Éxito de eclosión (%)
E07	1	8	4.20 \pm 0.14	0.014 \pm 0.00099	0.9359 \pm 0.045	22.0
E08	1	9	4.17 \pm 0.15	0.015 \pm 0.00091	1.0034 \pm 0.050	26.1
E09	1	6	4.36 \pm 0.36	0.017 \pm 0.00097	1.0632 \pm 0.066	57.5
E11	2	1	4.25 \pm 0.09	0.016 \pm 0.00059	1.0052 \pm 0.032	82.6
E12	2	4	4.16 \pm 0.14	0.015 \pm 0.00064	0.9612 \pm 0.027	88.1
E16	3	3	4.16 \pm 0.09	0.016 \pm 0.00071	1.0188 \pm 0.038	87.1
E17	3	1	4.21 \pm 0.15	0.016 \pm 0.00104	1.0240 \pm 0.050	85.3
E18	3	1	4.22 \pm 0.13	0.015 \pm 0.00075	0.9369 \pm 0.035	89.2
E19	3	2	4.14 \pm 0.10	0.015 \pm 0.00064	0.9801 \pm 0.038	81.6
E20	3	1	4.35 \pm 0.17	0.017 \pm 0.00115	1.0148 \pm 0.041	91.5

El análisis de correlación de Pearson mostró que hay una correlación inversamente proporcional, pero no significativa ($r=-0.0546$, $p=0.435$) entre la paternidad múltiple y el índice de condición relativo, por lo que no se encontró ninguna relación entre estas dos variables (Figura 4).



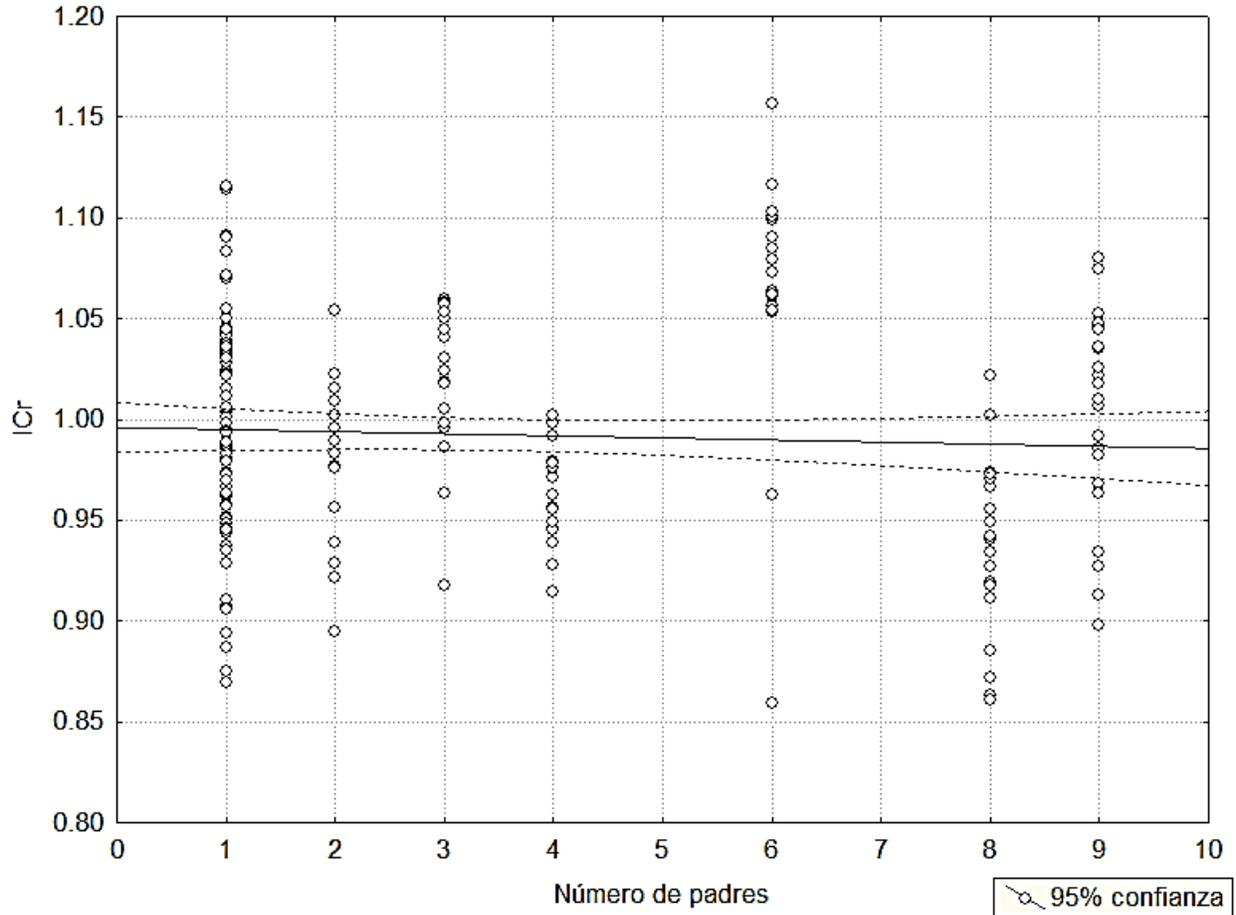


Figura 4. Correlación de la paternidad múltiple con el índice de condición relativo. Cada punto representa el índice de condición de una cría.

El análisis de correlación de Pearson para determinar la relación entre la paternidad múltiple y el éxito de eclosión mostró una relación inversamente proporcional ($r = -0.9240$) con una alta significancia ($p=0.00013$), esto sugiere que, entre más padres involucrados en la fecundación de una nidada, menor es el éxito de eclosión (Figura 5).



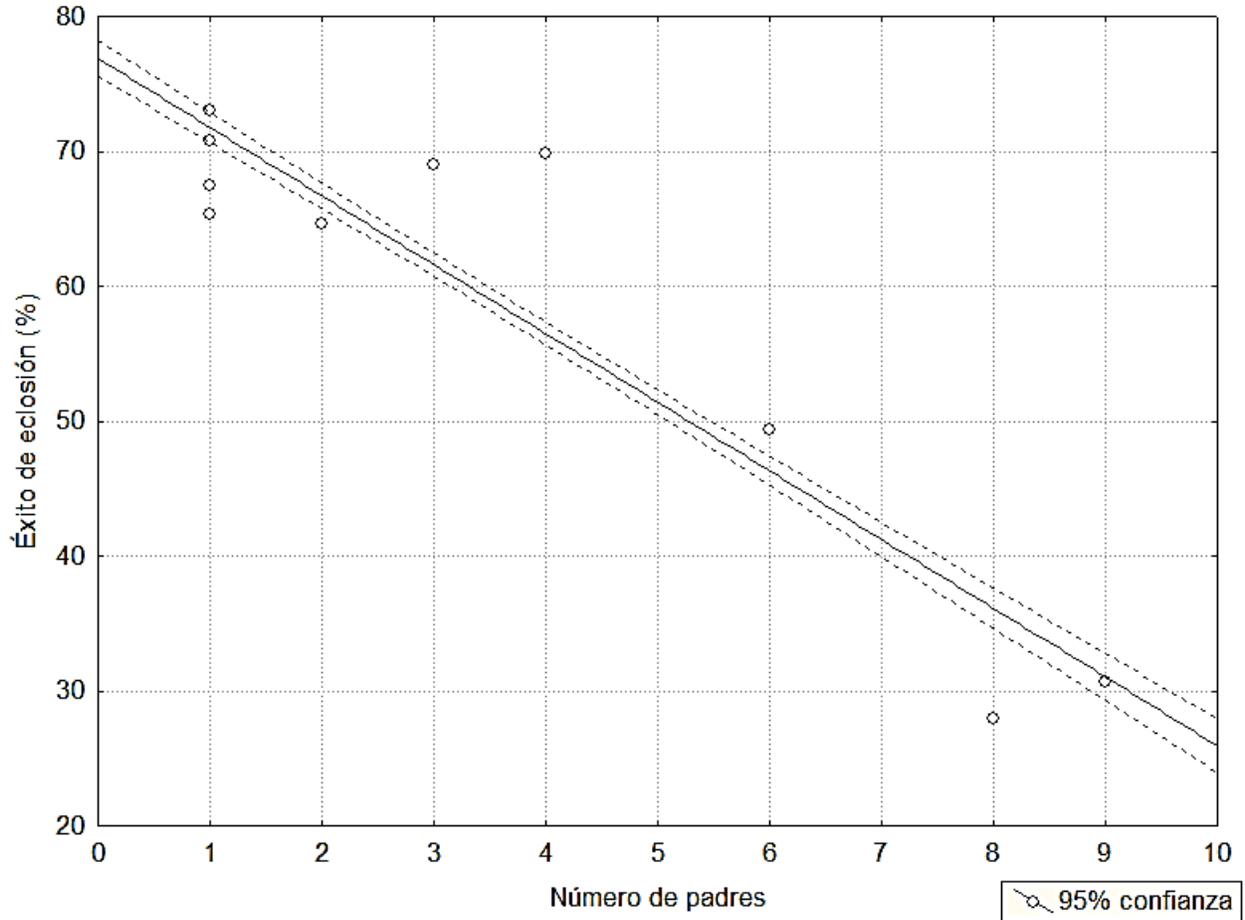


Figura 5. Correlación de la paternidad múltiple con el éxito de eclosión. Cada punto representa el éxito de eclosión de cada nido.

Aunque no se encontró una relación entre el grado de paternidad múltiple y el ICr de las crías, en la figura 6 se observan diferentes grados de variación del ICr entre las crías provenientes de los diferentes padres; las medias del ICr de las crías hijas también son diferentes entre padres.



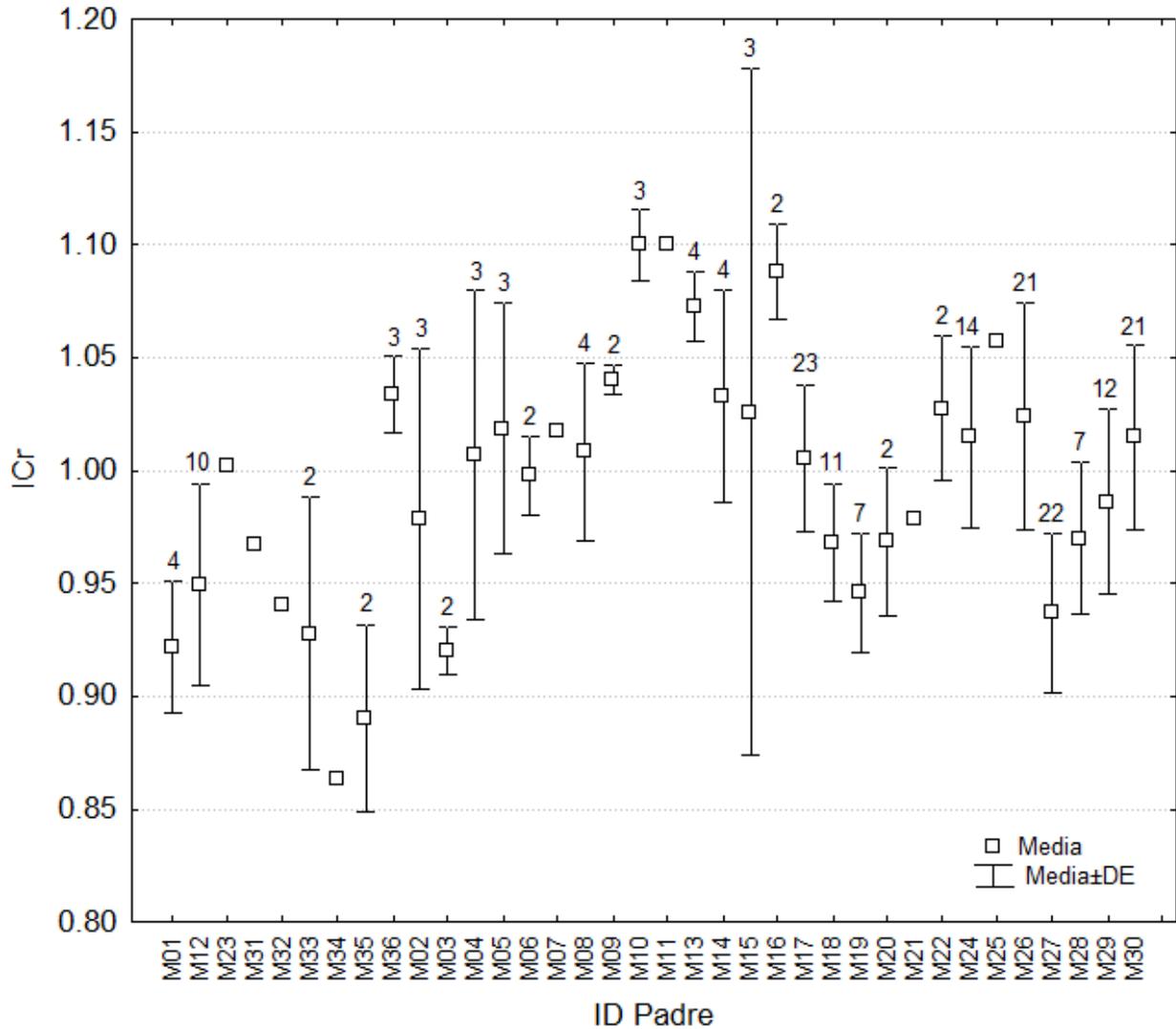


Figura 6. Índice de condición relativo de las crías producidas por cada macho identificado, el número en la parte superior indica el total de crías producidas por cada macho.

Con el fin de verificar la variación del ICr entre los nidos de acuerdo al grado de paternidad múltiple, el análisis de PERMANOVA de una vía, midiendo distancias euclidianas y con 9999 permutaciones, mostró que la variación del ICr es diferente entre nidadas con diverso grado de paternidad múltiple (pseudo-F=13.74, p=0.0001; Tabla VII).



Tabla VII. Resultados del análisis PERMANOVA para la comparación de la varianza del ICr de las crías con respecto al grado de paternidad múltiple de las nidadas; G.L: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MSC: Media de la suma de los cuadrados; PM: Paternidad múltiple.

Fuente de variación	G.L.	SC	MSC	Pseudo- <i>F</i>	P	Permutaciones
PM	6	0.19396	0.032326	13.747	0.0001	9953
Res	199	0.46796	0.0023515			
Total	205	0.66191				

En una última observación, encontramos que los individuos de la nidada fecundada por seis padres, alcanzó un ICr mayor que los demás nidos, lo que nos hace suponer que probablemente exista un número de padres óptimo para la fecundación, que presenta efectos positivos en la talla de las crías (Figura 7).



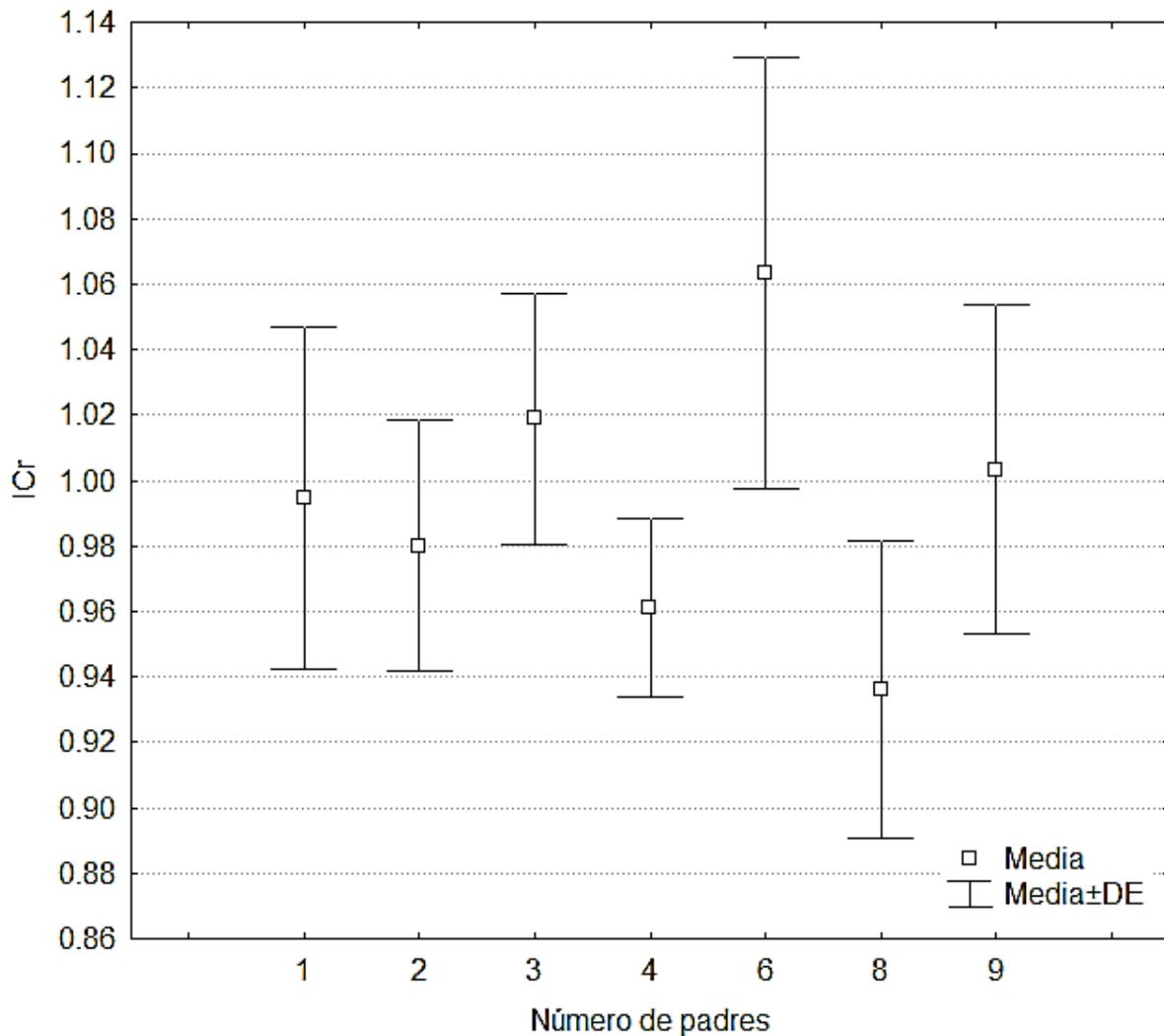


Figura 7. Índice de condición relativo con respecto al grado de paternidad múltiple (número de padres de una nidada).

8. Discusión

8.1 Amplificación de los microsatélites

Para el análisis de la paternidad múltiple se habían seleccionado inicialmente 11 microsatélites (Tabla I), seis marcados con fluorescencia y cinco con modificación de la sonda CAG, se realizó una prueba preliminar amplificando los 11 microsatélites para ocho individuos en tubos de PCR de 0.2 ml, y se logró la amplificación de todos los microsatélites observándose los picos de lectura para todos los microsatélites e individuos amplificados, pero al realizar la amplificación para los 274 individuos restantes



en placas de 96 pozos, no se lograron visualizar los picos de lectura de los cinco microsatélites marcados con la sonda CAG, esto pudo deberse a que las condiciones de la PCR variaron de acuerdo al grueso de la placa, con respecto a los tubos de PCR en los que fueron amplificadas previamente, y es por ello que solo pudieron ser visualizados los seis microsatélites marcados con fluorescencia.

8.2 Paternidad múltiple

En este trabajo, el porcentaje de paternidad múltiple obtenido fue de 60%, se identificaron entre uno y nueve padres por nidada, este porcentaje es ligeramente superior al reportado por Villegas-Zurita (2008), quien para esta misma playa encontró un 50% de paternidad múltiple y nidadas con uno, tres y cinco padres durante la temporada de anidación 1999-2000 y utilizando dos microsatélites (Cm84 y Ei8). Eso probablemente sea debido a que en este estudio se utilizaron cinco microsatélites para la genotipificación de los individuos, tres más de los que se utilizaron en el análisis de Villegas-Zurita, lo que permite un rango más amplio para la asignación de paternidad. En un trabajo de revisión, Lee *et al.* (2018) encontraron que la incidencia de paternidad múltiple varía entre 10% y 93% para todas las especies de tortugas marinas.

Se ha reportado la incidencia de paternidad múltiple en tortuga golfinas para playas de anidación solitaria y de arribada. Con respecto a las del primer tipo se ha reportado 20% de paternidad múltiple para Galibi, Suriname (Hokert *et al.* 2002), 30% para Playa Hermosa, Costa Rica (Jensen *et al.* 2006) y 75% en Punta Ratón, Honduras (Duran *et al.* 2015). En playas de arribada, además del trabajo de Villegas-Zurita (2008), solo se tiene el registro de 92% de incidencia de paternidad múltiple en Ostional, Costa Rica (Jensen *et al.* 2006); por lo que podríamos determinar que el 60% de paternidad múltiple encontrado en este estudio es intermedio.

Comparado con estudios anteriores de *L. olivacea* (Hoekert *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2006, Duran *et al.* 2015), este es el primer reporte de paternidad múltiple que presenta un número tan alto de machos (nueve) fecundando una sola nidada de tortugas golfinas. Se tiene otro antecedente para una población del Mediterráneo de *Chelonia mydas* en donde se identificaron 10 padres en una sola nidada mediante el programa COLONY,



este es el registro más alto de padres en una sola nidada para todas las especies de tortugas marinas (Turkozan *et al.* 2019).

Las diferencias reportadas en el número de padres identificados en distintos estudios de paternidad múltiple podría ser consecuencia de la herramienta usada para reconstruir los genotipos parentales. La mayoría de trabajos que han reportado la cantidad de padres que fecundan una nidada utilizaron el programa GERUD, que estima el número mínimo de padres por nidada a partir de un algoritmo que requiere un genotipo parental multilocus conocido (generalmente el materno) y genotipos multilocus de un grupo de descendientes, el algoritmo determina la contribución paterna a cada progenie restando el genotipo materno conocido haciendo todas las combinaciones posibles hasta encontrar el genotipo multilocus que se ajusta a los genotipos de todos los descendientes. Si el algoritmo encuentra varios genotipos paternos compatibles para la descendencia se determina un estadístico de chi cuadrada, donde el valor más bajo obtenido es el más probable (Jones 2005), lo cual puede indicar una subestimación del número de padres involucrados por nido. COLONY por su parte, trabaja bajo el enfoque de máxima verosimilitud de la descendencia completa (*Full-pedigree likelihood*; Jones & Wang 2010), estima simultáneamente datos de hermandad y paternidad, considerando la probabilidad de toda la descendencia y no solo de pares de individuos, lo que mejora la resolución de la asignación de paternidad. Esto nos permitiría sugerir, que los datos analizados con GERUD sean reanalizados con COLONY para poder hacer una comparación general. En este estudio tratamos de analizar los genotipos encontrados con GERUD, pero debido a la ausencia de algunos genotipos de los individuos analizados, el programa solo pudo realizar el análisis con dos de los cinco microsatélites en nidadas con hasta tres padres, para el resto de las nidadas no encontró una solución e incluso en algunas ocasiones, el programa dejó de funcionar.

8.3 Factores que influyen en la paternidad múltiple en tortugas marinas.

Como se ha evidenciado en diversos estudios, la poliandria es un sistema de apareamiento común en todas las especies de tortugas marinas (Lee & Hays 2004, Alfaro Nuñez *et al.* 2015). Se han propuesto varias posibles causas que explican la paternidad



múltiple en estas especies, las cuales podrían estar relacionadas con factores genéticos, fisiológicos, conductuales, demográficos, entre otros.

Según las observaciones que Pearse y Avise (2001) hicieron en diversas especies de tortugas, el apareamiento de una hembra con distintos machos podría relacionarse con algunos beneficios genéticos como lo es el aumento de la diversidad genética de la descendencia y en consecuencia mejorar su adecuación biológica (*fitness*). En este contexto Simmons (2005) propone dos posibles hipótesis para abordar los beneficios genéticos de la paternidad múltiple: a) *Calidad intrínseca del macho*, que explica que la paternidad debería estar sesgada hacia machos que proporcionen características que mejoren el rendimiento y adecuación de la descendencia mediante la herencia de “buenos genes”; y b) *Incompatibilidad genética*, la cual propone que los apareamientos con múltiples machos reducen la probabilidad de incompatibilidad entre los genomas paternos-maternos, lo que pudiera comprometer o disminuir la adecuación y rendimiento de la descendencia. Además, al aparearse con distintos machos, las hembras tienen la posibilidad de utilizar mecanismos postcopulatorios que aseguren que sus óvulos serán fertilizados con espermatozoides compatibles con su material genético (Simmons 2005).

Desde el punto de vista fisiológico, otro factor que nos permitiría entender mejor el porcentaje de paternidad múltiple encontrado es el almacenamiento de espermatozoides, que también tiene un papel fundamental en la reproducción de las tortugas y al parecer en la producción de nidadas con paternidad múltiple como lo mencionan Pearse y Avise (2001), ya que esta estrategia de reproducción permite que los óvulos producidos puedan ser fertilizados sin la necesidad de apareamientos continuos, el espermatozoides almacenado puede permanecer en los túbulos de almacenamiento de espermatozoides incluso durante varios años (Gist & Jones 1989).

A este respecto, Phillips *et al.* (2017) dieron seguimiento a las nidadas depositadas por hembras remigrantes de tortuga carey en Isla Cousine, Seychelles durante dos temporadas reproductivas, y encontraron evidencia de que una hembra fue fecundada por el mismo macho durante ambos periodos reproductivos. Los autores apuntan que este hecho pudiera deberse a patrones de almacenamiento espermático entre temporadas, sin embargo, se observó que en la última nidada de la segunda temporada,



el 66% de los huevos no se desarrollaron, lo que podría indicar una disminución de la calidad y la cantidad de esperma almacenado. Esta evidencia, es la primera reportada para tortugas marinas, por lo cual se requiere realizar estudios similares para corroborar estas observaciones y determinar si el almacenamiento espermático es uno de los principales factores que promueve la paternidad múltiple en tortugas marinas.

Además de los factores fisiológicos, Plotkin *et al.* (1996) sugieren que el apareamiento de las tortugas golfinas es más intenso al principio de la temporada, debido a que los machos se quedan en el área cercana a la costa durante algún tiempo, pero se van alejando a aguas profundas conforme la temporada de anidación va avanzando. La temporada de reproducción está asociada con los niveles hormonales, siendo la testosterona la que regula el comportamiento de las hembras y de los machos en el apareamiento, cuando los niveles de testosterona se encuentran muy altos, las hembras parecen ser más receptivas a la cópula. Durante este periodo, las hembras pueden tener múltiples cópulas para evitar la limitación de esperma, considerando que las oportunidades de apareamiento son impredecibles (Bernardo & Plotkin 2007). Posteriormente, cuando los niveles de testosterona caen, se puede observar una baja actividad de los machos, y las hembras permanecen en aguas superficiales para evitar el contacto con ellos. En los meses de julio y agosto después del apareamiento, las hembras que anidan en arribada ovopositan de dos a cuatro nidos aproximadamente cada 14 o 28 días durante la temporada de anidación, dependiendo si anidan de manera solitaria o en arribada (Lutz *et al.* 2003).

Plotkin *et al.* (1996), plantea que los machos de tortuga golfina migran hacia las áreas de alimentación a la mitad de la temporada de anidación, ya que la mayoría de las hembras ya se han apareado, lo que provoca que un apareamiento sea poco probable hacia al final de la temporada de anidación. Si unimos estos tres supuestos (almacenamiento espermático, niveles hormonales y la disponibilidad de machos para el apareamiento), y los comparamos con los resultados obtenidos, podemos sugerir que conforme la temporada de reproducción avanza, los machos son escasos y/o el almacenamiento de esperma se va agotando, y probablemente es por eso que en las últimas arribadas se encuentra un mayor número de nidadas sin paternidad múltiple y, si



se encuentran nidadas que presentan paternidad múltiple, se puede deber a que provienen de hembras con mayor capacidad de almacenamiento de esperma.

Por otro lado, es necesario considerar las fechas en las que se tomaron las muestras del presente estudio, ya que de acuerdo con la paternidad múltiple que encontramos, se puede observar un decremento en la cantidad de padres involucrados en la fecundación de las nidadas, mientras la temporada de anidación va avanzando, es decir, que las nidadas provenientes de la última arribada presentaron solo uno o dos padres (Anexo II).

Lee & Hays (2004) observaron que el grado de paternidad múltiple también puede depender del acoso que sufren las hembras por parte de los machos para el apareamiento, en esta época los machos tienden a ser más agresivos y suelen causar mucho daño físico a las hembras, es por esto que las hembras pueden dejar montarse por cualquier macho que se encuentren para evitar un gasto energético innecesario y así evadir el comportamiento agresivo que los machos presentan en la época de reproducción.

Comparando los niveles de paternidad múltiple entre una playa de anidación solitaria (30%) y una playa de arribada (92%) de tortuga golfina, Jensen *et al.* (2006) sugieren que otro factor involucrado en la incidencia de paternidad múltiple, es la abundancia de reproductores: a mayor abundancia de individuos, mayor incidencia de paternidad múltiple. Esta hipótesis fue puesta a prueba por Tedeschi *et al.* (2015) en tortugas caguamas de Australia y por Duran *et al.* (2015) en una playa de anidación solitaria de tortugas golfinas de Honduras, en ambos trabajos no encontraron una relación entre el grado de paternidad múltiple y el tamaño de las poblaciones anidadoras. Lee *et al.* (2018) realizaron una compilación de trabajos de paternidad múltiple publicados para todas las especies de tortugas marinas de diferentes playas del mundo (incluyendo el trabajo de Villegas-Zurita de 2008), y tampoco encontraron una relación entre la incidencia de paternidad múltiple y el tamaño de las poblaciones anidadoras. El presente trabajo constituye una evidencia más de que el grado de paternidad múltiple no se relaciona con el tamaño poblacional, ya que Playa de Escobilla es la playa de anidación



más numerosa a nivel mundial (Valverde *et al.* 2012) y no se encuentra entre las de mayor incidencia de paternidad múltiple.

Sin embargo, Lee *et al.* (2018), encontraron con base en datos obtenidos por rastreo satelital (GPS) de tortugas caguamas y laúd que, aunque la incidencia de paternidad múltiple no está relacionada con la abundancia poblacional, sí lo está con la densidad de individuos que se encuentran en las zonas de apareamiento. Estos autores sugieren que las colonias relativamente grandes con baja incidencia de paternidad múltiple, cuentan con una baja densidad de individuos en las zonas de apareamiento y viceversa. Esta hipótesis tendrá que ser puesta a prueba en el futuro, Playa de Escobilla es una zona de reproducción clave para este nuevo tipo de estudios por el elevado número de hembras que se agregan para anidar, se estima que en cada temporada de arribada las tortugas golfinas depositan alrededor de un millón de nidadas (Peralta & Luna 2016).

8.4 Paternidad múltiple e índice de condición relativo

Esperábamos encontrar una relación entre la paternidad múltiple y el ICr, sin embargo no fue así. En el 2009, McLeod y Marshall estudiaron la paternidad múltiple en una especie de poliqueto (*Galeolaria caespitosa*), en donde encontraron que los huevos que fueron fertilizados bajo condiciones de poliandria, tenían un mayor éxito de fertilización y aunado a eso, las larvas eclosionadas de esos huevos tenían un mayor éxito de sobrevivencia, lo que supondría un incremento en la diversidad genética y una menor competencia entre los individuos de la misma puesta al ser genéticamente distintos. Por su parte, Gyuris (2000), encontró que las crías de tortuga verde de mayor tamaño tienen extremidades más grandes, esto les permite tener una velocidad de arrastre mayor en comparación con las pequeñas, que son más susceptibles a la depredación, lo que hace que las crías más grandes tengan una mayor probabilidad de supervivencia en su trayecto de la costa hacia el mar después de la emergencia.

De acuerdo a lo encontrado por McLeod y Marshall (2009), debido a la aptitud de supervivencia que mostraban las crías en su estudio y según lo reportado por Gyuris (2000), esto nos hacía suponer que entre más padres tuviera una nidada, el ICr sería



mayor, es decir, las crías serían más grandes y pesadas, esperando que estas crías fueran las más aptas para sobrevivir. Sin embargo, no se encontró ninguna relación significativa entre estos dos aspectos.

Existen estudios que plantean que el éxito de emergencia, el éxito de eclosión, el largo, la masa corporal y la velocidad de arrastre, determinan la calidad de las crías, la cual puede estar determinada por los niveles de paternidad múltiple (Pearse y Avise 2001, Alfaro-Núñez *et al.* 2015, González-Garza *et al.* 2015), sin embargo, Maulany *et al.* (2012) señala que la temperatura puede ser el factor determinante para los rasgos morfológicos y locomotores de las crías, ya que encontró que altas temperaturas de incubación provocan efectos negativos en la locomoción de las crías, esto las hace más susceptibles para la depredación mientras se arrastran hacia la línea de costa desde el nido del que provienen. Booth y Evans (2011) encontraron que nidos de tortuga verde y tortuga caguama que han sido incubados a temperaturas por debajo de los 30°C, producen crías más grandes, con respecto a las temperaturas medias de los nidos analizados en este estudio (31.4°C \pm 0.56). Tampoco encontramos una relación entre el ICr de las crías y la temperatura promedio (Anexo II), aunque no podemos descartar la existencia de un efecto de la temperatura sobre el tamaño de las crías de tortuga golfina de los nidos analizados en Playa de Escobilla, en un futuro será conveniente hacer un análisis más profundo a este respecto.

Aunque no existe una relación, en los gráficos de dispersión podemos observar que existe una fluctuación entre los nidos con uno, dos, tres y cuatro padres, sin embargo el nido con seis padres (nido nueve) mostró el valor más alto del ICr, y posteriormente, conforme aumenta el número de padres empieza a disminuir nuevamente (Figura 7). Analizamos los datos por separado, es decir, analizamos cuáles eran las tendencias con respecto a la talla y el peso por separado, también analizamos el área del caparazón (solo para descartar una relación entre el área del caparazón y el grado de paternidad múltiple), y la tendencia era exactamente la misma, el nido con seis padres, siempre tenía los valores más altos. Esto puede sugerir que existe un número de padres óptimo para que las crías alcancen los pesos y las tallas más altas (Anexo III), pero sería necesario



analizar un mayor número de nidos con diferentes niveles de paternidad múltiple para corroborar la tendencia.

El que las crías alcancen las tallas y los pesos más altos, también podría ser afectado por el tamaño de la puesta, ya que de acuerdo con Ackerman (1980), los nidos más pequeños tienen periodos más cortos de incubación y un mejor intercambio de gases, lo que permite un desarrollo más rápido de las crías, debido a que a mayor masa de huevos la tasa de desarrollo embrionario se reduce y la mortalidad aumenta, esto como consecuencia de una respuesta adaptativa a la hipoxia. En las nidadas que aquí se analizaron, la nidada con los valores más altos del ICr (el nido con seis padres) tiene una puesta de 40 huevos (cuando el promedio de puesta por nidada es de $89 \pm 25.8DE$, Anexo IV), así que se podría considerar como una puesta chica con respecto a las demás, lo que nos haría suponer que esto pudiera tener efectos sobre el desarrollo de las crías, al tener mayor eficiencia sobre los recursos disponibles dentro de la nidada (Anexo II).

Cuando comparamos la variación del ICr entre crías provenientes de diferentes padres con el análisis de PERMANOVA, pudimos observar que existe una variación entre estas medidas, lo que nos indica que existe una contribución paterna, ya que aunque las crías provienen de la misma madre, no presentan los mismos tamaños. Aunque no pudimos establecer una relación entre el ICr y la paternidad múltiple, podemos inferir que existe una contribución paterna hacia las características de las crías, debido a que existe un macho dominante que fecunda una mayor cantidad de huevos dentro de las nidadas que presentan paternidad múltiple (Anexo V), podríamos inferir que existe una contribución paterna hacia las características de las crías. Para corroborar esta información, sería necesario contar con diferentes nidadas fecundadas por el mismo macho dominante, para obtener el ICr de las crías y el éxito de eclosión de la nidada, para hacer una comparación significativa de este supuesto y así poder determinar si existe en realidad una contribución paterna y de qué manera esto puede beneficiar a las crías. Desafortunadamente, en este estudio no se encontraron nidadas que fueran fecundadas por el mismo macho.



8.5 Paternidad múltiple y éxito de eclosión

De acuerdo con los datos analizados, se encontró una relación inversamente proporcional entre el éxito de eclosión y el número de padres, es decir, que entre más padres involucrados en una nidada menor fue el éxito de eclosión.

Alfaro-Nuñez *et al.* (2015) encontraron que las crías de nidadas fecundadas por dos o tres machos son significativamente más grandes en cuanto al peso y largo, aunque para el caso del éxito de emergencia, las nidadas con dos padres fueron las que presentaron los valores más bajos. Con respecto a nuestros datos, la nidada con las crías más grandes presentó seis padres y, 57.5% de éxito de eclosión, aunque no es un número bajo, habría que considerar si en realidad el que sean grandes corresponde a un rasgo ventajoso para las crías y las colonias de tortugas golfinas en general.

Si bien el análisis de la temperatura de incubación no fue parte de nuestros objetivos, es importante mencionar que la temperatura óptima de incubación para la especie *L. olivacea*, es de 30-32°C y la mortalidad aumenta en temperaturas por debajo de los 27°C y por arriba de 34°C (Márquez 2002). Se ha observado que cuando las crías en desarrollo embrionario se exponen a estas temperaturas, sufren efectos sobre el sexo, el éxito de emergencia, la morfología y el desempeño locomotor (Sim *et al.* 2015). Los éxitos de eclosión más bajos registrados en este estudio, coincidieron con el registro de las temperaturas promedio más altas ($T = 32.17 \pm 0.25\text{DE}$), a diferencia de los nidos con los éxitos de eclosión más altos, que presentaron las temperaturas de incubación promedio más bajas ($T = 31.08 \pm 0.20\text{DE}$).

Se ha observado que en la tortuga golfina, las bajas temperaturas de incubación (24°C-29°C) afectan el desarrollo de los embriones en estadios de desarrollo tardíos, y las temperaturas altas (31°C-14°C) tienen efectos negativos en etapas tempranas de desarrollo. La temperatura también tiene injerencia en el tamaño de la cría, ya que estas alcanzan un máximo de tamaño cuando la temperatura alcanza niveles medios de incubación (30°C); cuando se alcanzan temperaturas altas de incubación, el embrión se desarrolla más rápido, lo que causa que las crías sean más pequeñas, debido a que el embrión no tiene tiempo suficiente para disponer de los nutrientes que el huevo le provee;



y aunque a bajas temperaturas podemos encontrar crías más grandes, estas alcanzan su máximo a temperaturas intermedias. Ocurre lo mismo con su capacidad de nado, alcanzan su mejor desempeño a temperaturas intermedias, esto indica que las temperaturas intermedias de incubación son ideales ya que esto les permite a las crías alcanzar tamaños grandes, una mejor locomoción y bajas tasas de mortalidad, lo que conduciría a un mayor éxito de eclosión (Mueller *et al.* 2019). Por ello es necesario realizar un análisis más profundo con respecto a las temperaturas extremas sostenidas y en qué momentos del desarrollo embrionario se dan, para comprobar si existen efectos negativos o positivos de la temperatura sobre los nidos estudiados, para aceptar o rechazar el efecto de la paternidad múltiple sobre el éxito de eclosión de las nidadas (Anexo VI).

Aunque los resultados obtenidos muestran una tendencia de lo que podría estar pasando con las crías de tortuga golfinia, creemos que la muestra analizada no es representativa para una colonia tan grande de tortugas como la de Playa de Escobilla, en donde se han llegado a encontrar más de un millón de nidadas en la temporada de anidación (Peralta & Luna 2016), por lo que sugerimos hacer un análisis más extenso, para poder complementar lo observado en este estudio con respecto al ICr de las crías y al éxito de eclosión de las nidadas. Es importante analizar el efecto de la temperatura de incubación en las crías, ya que el efecto de esta variable podría desencadenar efectos positivos o negativos en el ICr y el éxito de eclosión de las nidadas. Para entender por qué hay diferentes niveles de PM entre playas de anidación, incluso de la misma especie, es necesario integrar datos sobre la densidad de reproductores en la zona de apareamiento y la proporción de sexos; mientras que, para indagar sobre los beneficios de la paternidad múltiple en la descendencia, es necesario contar con datos del desempeño locomotor de las crías y analizar de manera más profunda los efectos de la temperatura de incubación.



9. Conclusiones

1. Se encontró 60% de paternidad múltiple en las diez nidadas de *Lepidochelys olivacea* de Playa de Escobilla de la temporada de reproducción 2016-2017.
2. Se encontró un máximo de nueve padres para las nidadas con paternidad múltiple y un promedio de 3.6 padres por nido.
3. Existe un macho dominante entre las nidadas con paternidad múltiple, la fecundación va del 17% al 82% dependiendo el número de padres en la nidada.
4. No se encontró una relación entre el nivel de paternidad múltiple y el índice de condición relativo de las crías de tortuga golfinia de Playa de Escobilla.
5. Se encontró una relación inversamente proporcional entre la paternidad múltiple y el éxito de eclosión, aunque hay que tomar en cuenta que tal vez, la temperatura pueda estar asociada a esta tendencia.
6. Es necesario ahondar en establecer los factores que influyen sobre la frecuencia de paternidad múltiple en Playa de Escobilla, tales como: la densidad de reproductores y la estimación de la proporción de sexos en zonas de apareamiento cercanas a esta playa de arribada, el almacenamiento espermático, el número de padres óptimo o el tamaño de la puesta.



10. Referencias

- Abreu-Grobois, F. A. 1999. Genética poblacional y filogeografía de las tortugas marinas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) y laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico mexicano. Informe final SNIB-CONABIO proyecto G007.
- Abreu-Grobois, A., & P. Plotkin. 2008. *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group 6-8.
- Ackerman, R.A. 1980. Physiological and ecological aspects of gas exchange by sea turtle eggs. *American Zoologist* 20(3): 575-583.
- Aggarwal, R.K., T.P. Velavan, D. Udaykumar, P.S. Hendre, K. Shanker, B.C. Choudhury & L. Singh. 2004. Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Molecular Ecology Notes* 4(1): 77-79.
- Aggarwal, R.K., A. Lalremruata, T.P. Velavan, A.P. Sowjanya & L. Singh. 2008. Development and characterization of ten novel microsatellite markers from olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Conservation Genetics* 9(4): 981-984.
- Alcock, J. 1984. *Animal behavior: An evolutionary Approach*. 3ra ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Alfaro-Núñez, A., M.P. Jensen & F.A. Abreu-Grobois. 2015. Does polyandry really pay off? The effects of multiple mating and number of fathers on morphological traits and survival in clutches of nesting green turtles at Tortuguero. *PeerJ* 3, e880.
- Anderson, M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology* 26(1): 32-46.
- Anderson M.J., Gorley R.N., Clarke K.R. 2008. *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods*. PRIMER-E Limited.
- Arriaga C.L., E. Vázquez-Cabrera, J. González-Cano, R. Jiménez-Rosenberg, E. Muñoz-López & V. Aguilar-Sierra. 1998. *Regiones marinas prioritarias de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Asuar L.E. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. Pp: 517-539 *In*: Eguiarte, L. & V. Souza. *Ecología molecular*. INECC.
- Berglund, A., G. Rosenqvist, & I. Svensson. 1989. Reproductive success of females limited by males in two pipefish species. *The American Naturalist* 133(4): 506-516.



- Bernardo, J. & P. Plotkin. 2007. An evolutionary perspective on the arribada phenomenon and reproductive behavioral polymorphism of olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). Pp 59-87. *In*: Plotkin, P. Biology and conservation of Ridley sea turtles. The John Hopkins University Press. Baltimore, EUA.
- Bjorndal, K.A, A.B. Bolten & M.Y. Chaloupka. 2000. Green turtle somatic growth model: Evidence for density dependence. *Ecological Applications* 10(1): 269–282.
- Booth, D.T. & A. Evans. 2011. Warm water and cool nests are best. How global warming might influence hatchling green turtle swimming performance. *PLoS One* 6(8): e23162.
- Boutin-Ganache, I., M. Raposo, M. Raymond, & C.F. Deschepper. 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques* 31(1): 25-28.
- Castagnino, J.M. 2000. Electroforesis capilar. *Bioquímica* 25(1): 13-32.
- CONANP. 2008. Programa de monitoreo de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua. México.
- Cornejo, R.A., D.A. Serrato, A.B. Rendón & M.M.G. Rocha. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC, UAM-I, 256 pp.
- Davies, N.B. 1983. Polyandry, cloaca-pecking and sperm competition in dunnocks. *Nature* 302(5906): 334.
- Davies, N.B. & A. Lundberg. 1984. Food distribution and a variable mating system in the dunnock, *Prunella modularis*. *The Journal of Animal Ecology* 53(3): 895-912.
- Díaz, A.S., L.F. Rentería, J.A. Cortez & E.S. Palacios. 2014. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Pp: 53-73 *In*: Cornejo, R.A. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC, UAM-I.
- Duran, N., S.G. Dunbar, R.A. Escobar III & T.G. Standish. 2015. High frequency of multiple paternity in a solitary population of olive ridley sea turtles in Honduras. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 463(2015): 63-71.
- Dutton, P.H. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell. *Proceedings of the international*



- symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-396.
- FitzSimmons, N.N., C. Moritz & S.S. Moore. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12(3): 432-440.
- FitzSimmons, N.N. 1996. Use of microsatellite loci to investigate multiple paternity in marine turtles. Pp: 69-78 *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell. Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-396.
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22(4): 241-253.
- Gist, D.H., & J.M. Jones. 1989. Sperm storage within the oviduct of turtles. *Journal of Morphology* 199(3): 379-384.
- González-Garza, B.I., A. Stow, L.F. Sánchez-Teyer & O. Zapata-Pérez. 2015. Genetic variation, multiple paternity, and measures of reproductive success in the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Ecology and Evolution*, 5(24): 5758-5769.
- González-Garza, B.I., L.F. Sánchez-Teyer & O. Zapata-Pérez. 2016. Sea turtle hatchling carapace as a source of high quantity and quality DNA. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 51(1): 217-222.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86(6): 485-486.
- Gyuris, E. 2000. The relationship between body size and predation rates on hatchlings of the green turtle (*Chelonia mydas*): is bigger better?. Pp: 143-147. *In*: Sea Turtles of the Indo-Pacific: Research, Management and Conservation. Academic Press
- Hoekert, W.E.J., H. Neufeglise, A.D. Schouten & S.B.J Menken. 2002. Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive Ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* 89(2): 107-113.



- Howe, M., N.N. FitzSimmons, C.J. Limpus & S.M. Clegg. 2018. Multiple paternity in a Pacific marine turtle population: maternal attributes, offspring outcomes and demographic inferences. *Marine Biology* 165(1): 2.
- Jensen, M.P., F.A. Abreu-Grobois, J. Frydenberg & V. Loeschcke. 2006. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Molecular Ecology* 15(9): 2567–2575.
- Jensen, M.P., C.D. Allen, T. Eguchi, I.P. Bell, E.L. LaCasella, W.A. Hilton & P.H. Dutton. 2018. Environmental warming and feminization of one of the largest sea turtle populations in the world. *Current Biology* 28(1): 154-159.
- Jones, A.G. 2005. GERUD2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* 5(3): 708-711.
- Jones, O.R. & J. Wang. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 551–555.
- Labrada-Martagón, V., L.C. Méndez-Rodríguez, S.C. Gardner, V.H. Cruz-Escalona & T. Zenteno-Savín. 2010. Health indices of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. II. Body condition index. *Chelonian Conservation and Biology* 9(2): 173-183.
- Le Cren, E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *The Journal of Animal Ecology* 20(2): 201–219
- Lee, P.L., G. Schofield, R.I. Haughey, A.D. Mazaris & G.C. Hays. 2018. A review of patterns of multiple paternity across sea turtle rookeries. Pp: 1-31. *In: Advances in marine biology*. Academic Press.
- Lee, P. L. & G.C. Hays. 2004. Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(17): 6530-6535.
- Lobato, B. 2015. Caracterización de las playas la Escobilla y Morro Ayuta como sitios de anidación masiva de *Lepidochelys olivacea* (Eschcholtz 1829), Oaxaca. Tesis de Maestría. Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- Lutz, P.L., J.A. Musick & J. Wyneken. 2003. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, USA, 455 pp.



- Magaña, J.J., M.D.L.L Arenas-Sordo & R. Gómez. 2009. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista Médica de Chile* 137(7): 946-956.
- Márquez, R. 2002. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. 3ª ed., La ciencia para todos, Fondo de Cultura Económica, Ciudad de México, 197 pp.
- Maulany, R.I., D.T. Booth & G.S. Baxter. 2012. The effect of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Marine Biology* 159(12): 2651-2661.
- McLeod, L. & D.J. Marshall. 2009. Do genetic diversity effects drive the benefits associated with multiple mating? A test in a marine invertebrate. *PLoS One* 4(8): e6347.
- Miller, J.D. 2000. Determinación del tamaño de la nidada y el éxito de la eclosión. Pp. 143-149 *In*: Eckert, K.L., K.A Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois & M. Donnelly. 2000. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo especialista en tortugas marinas UICN/CSE. Publicación 4.
- Morin, P.A., K.E. Chambers, C. Boesch & L. Vigilant. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10(7): 1835-1844.
- Morin, P.A., C. Manaster, S.L. Mesnick & R. Holland. 2009. Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with Allelogram. *Molecular Ecology Resources* 9(6): 1451-1455.
- Mueller, M.S., N.A. Ruiz-García, A. García-Gasca & F.A. Abreu-Grobois. 2019. Best swimmers hatch from intermediate temperatures: Effect of incubation temperature on swimming performance of olive ridley sea turtle hatchlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 519(2019): 1-15.
- Peakall, R., & P.E. Smouse. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537–2539.



- Pearse, D.E. & J.C. Avise. 2001. Turtle mating systems: behavior, sperm storage, and genetic paternity. *Journal of Heredity* 92(2): 206-211.
- Peralta, E & T. Luna. 2016. Tortuga Golfina. Pp. 81-101 *In*: Gaona, O. & A. Barragán. Las Tortugas marinas en México: logros y perspectivas para su conservación. Soluciones ambientales, ITZENI. Ciudad de México, 240 pp.
- Phillips, K.P., T.H. Jorgensen, K.G. Jolliffe, S.M. Jolliffe, J. Henwood & D.S Richardson. 2013. Reconstructing paternal genotypes to infer patterns of sperm storage and sexual selection in the hawksbill turtle. *Molecular Ecology* 22(8): 2301-2312.
- Phillips, K.P., T.H. Jorgensen, K.G. Jolliffe & D.S Richardson. 2014. Potential inter-season sperm storage by a female hawksbill turtle. *Marine Turtle Newsletter* (140): 13-14.
- Phillips, K.P., T.H. Jorgensen, K.G. Jolliffe & D.S. Richardson. 2017. Evidence of opposing fitness effects of parental heterozygosity and relatedness in a critically endangered marine turtle. *Journal of evolutionary biology* 30(11): 1953-1965.
- Plotkin, P.T., D.W Owens, R.A. Byles & R. Patterson. 1996. Departure of male olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) from a nearshore breeding ground. *Herpetologica* 52(1): 1-7.
- Reichert, H.A. 1993. Synopsis of biological data on the olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) in the western Atlantic. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Science Center. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-336
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18(2): 233-234.
- Shamblin, B.M., B.C. Faircloth, M. Dodd, A. Wood-Jones, S.B. Castleberry, J.P. Carroll & C.J. Nairn. 2007. Tetranucleotide microsatellites from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology Notes* 7(5): 784-787.
- Shamblin, B.M., B.C. Faircloth, M.G. Dodd, D.A. Bagley, L.M. Ehrhart, P.H. Dutton & C.J Nairn. 2009. Tretranucleotide markers from loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Conservation Genetics* 10(3): 577-580.



- Sim, E.L., D.T. Booth & C.J. Limpus. 2015. Incubation temperature, morphology and performance in loggerhead (*Caretta caretta*) turtle hatchlings from Mon Repos, Queensland, Australia. *Biology Open* 4(6): 685-692.
- Simmons, L.W. 2005. The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36(2005): 125-46.
- Tedeschi, J. N., N.J. Mitchell, O. Berry, S. Whiting, M. Meekan & W.J. Kennington. 2015. Reconstructed paternal genotypes reveal variable rates of multiple paternity at three rookeries of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in Western Australia. *Australian Journal of Zoology* 62(6): 454-462.
- Thonhauser, K.E., S. Raveh, & D.J. Penn. 2014. Multiple paternity does not depend on male genetic diversity. *Animal behavior* 93(2014): 135-141.
- Turkozan, O., S. Karaman, C. Yilmaz & N. Beser. 2019. Multiple paternity at the largest green turtle (*Chelonia mydas*) rookery in the Mediterranean. *Regional Studies in Marine Science* 31(2019): 1-7.
- Uller, T. & M. Olsson. 2008. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. *Molecular Ecology* 17(11): 2566-2580.
- Valverde, R. A., C.M. Orrego, M.T. Tordoir, F.M. Gómez, D.S. Solís, R.A. Hernández, G.B. Gómez, L.S. Brenes, J.P. Baltodano, L.G. Fonseca & J.R. Spotila. 2012. Olive Ridley mass nesting ecology and egg harvest at Ostional Beach, Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology* 11(1): 1-11.
- Van Oosterhout C., W.F. Hutchinson, D.P. Willis & P. Shipley. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4(3): 535-538 .
- Varo-Cruz, N., C. Monzón-Argüello, M. Carrillo, P. Calabuig & A. Liria-Loza. 2015. Tortuga olivácea - *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). *In: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Vázquez, L.Y.A. & G.A.E. Morales. 2014. Microsatélites. Pp: 75-100 *In: Cornejo, R.A., D.A. Serrato, A.B. Rendón, & M.M.G. Rocha. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT, INECC, UAM-I



- Villegas-Zurita, F. 2008. Frecuencia de paternidad múltiple en tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) de la playa Escobilla, Oaxaca, durante la temporada de anidación 1999-2000. Tesis de Maestría, Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- Yasui, Y. 1998. The genetic benefits of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology & Evolution* 13(6): 246-250.
- Zbinden, J.A., C.R Largiadèr, F. Leippert, D. Margaritoulis & R. Arlettaz. 2007. High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology* 16(17): 3703-3711.



11. Anexos

Anexo I. Frecuencias alélicas obtenidas de la submuestra conformada por las hembras anidadoras.

Locus	Tamaño del alelo (pb)	Frecuencia	Locus	Tamaño del alelo (pb)	Frecuencia
OR-18	121	0.850	OR-22	221	0.350
	123	0.150		223	0.050
OR-11	192	0.150		225	0.050
	204	0.050	229	0.050	
	206	0.100	231	0.050	
	208	0.050	233	0.150	
	210	0.100	235	0.200	
	212	0.100	237	0.050	
	214	0.050	239	0.050	
	216	0.050	Cm84	321	0.050
	218	0.100		323	0.100
	220	0.050		325	0.250
	222	0.050		327	0.050
	224	0.050		329	0.050
	228	0.050		331	0.100
234	0.050	335		0.200	
OR-20	99	0.300		337	0.050
	105	0.050		341	0.100
	113	0.100		343	0.050
	115	0.300	OR-1	145	0.200
	117	0.250		149	0.300
		153		0.050	
		157		0.100	
		161		0.100	
		165		0.150	
		173		0.050	
		197		0.050	



Anexo II. Diagrama de caja para representar la variación de la media del número de padres con respecto a la arribada, del ICr con respecto a la puesta y del ICr con respecto a la temperatura de incubación.

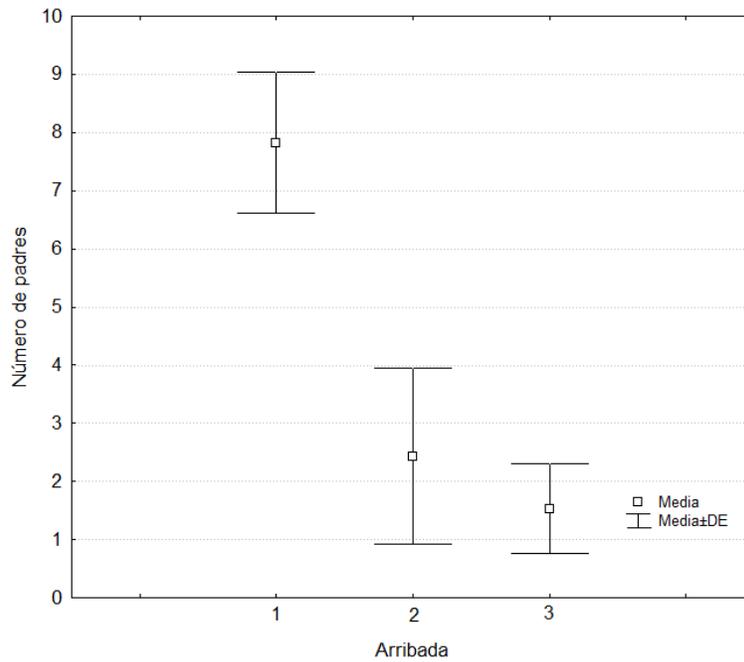


Figura 8. Variación de la media del número de padres con respecto a la arribada.

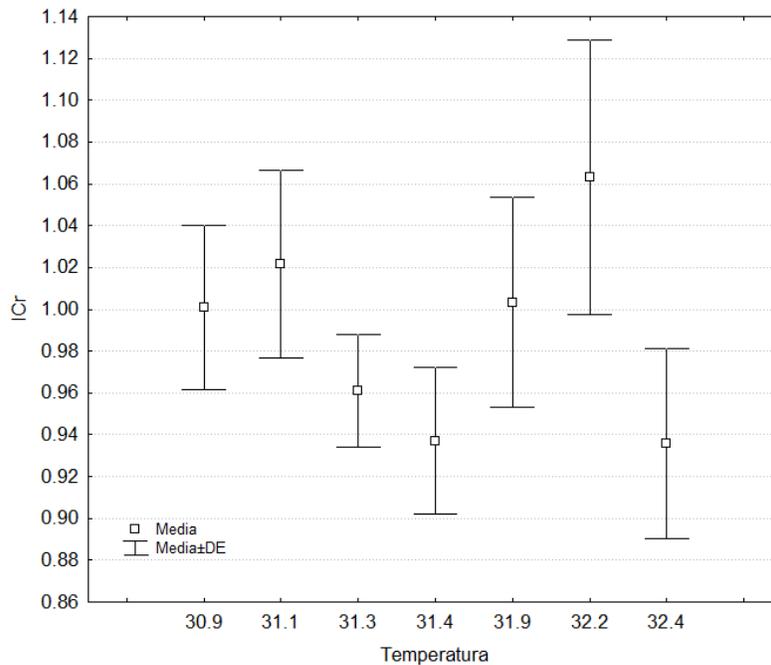


Figura 9. Variación de la media del ICr con respecto a la temperatura de incubación.



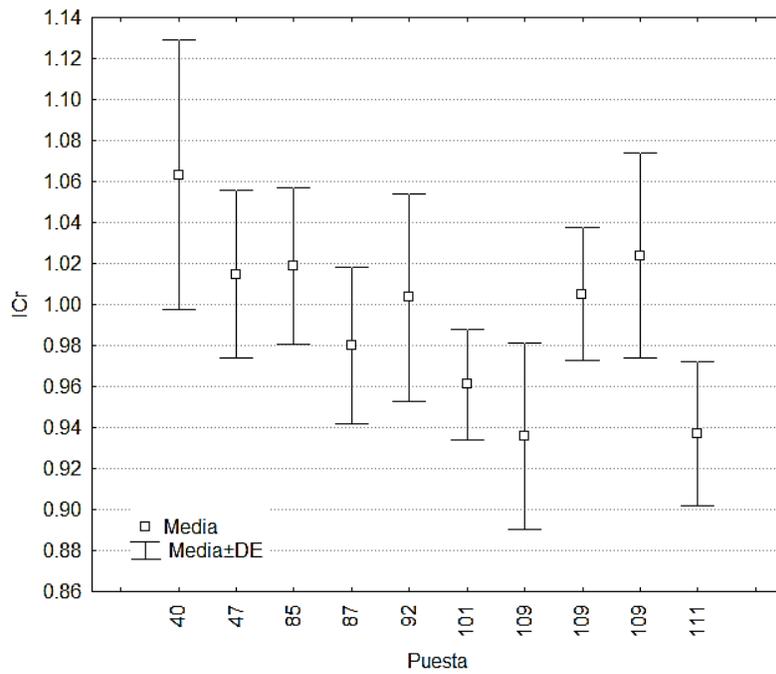
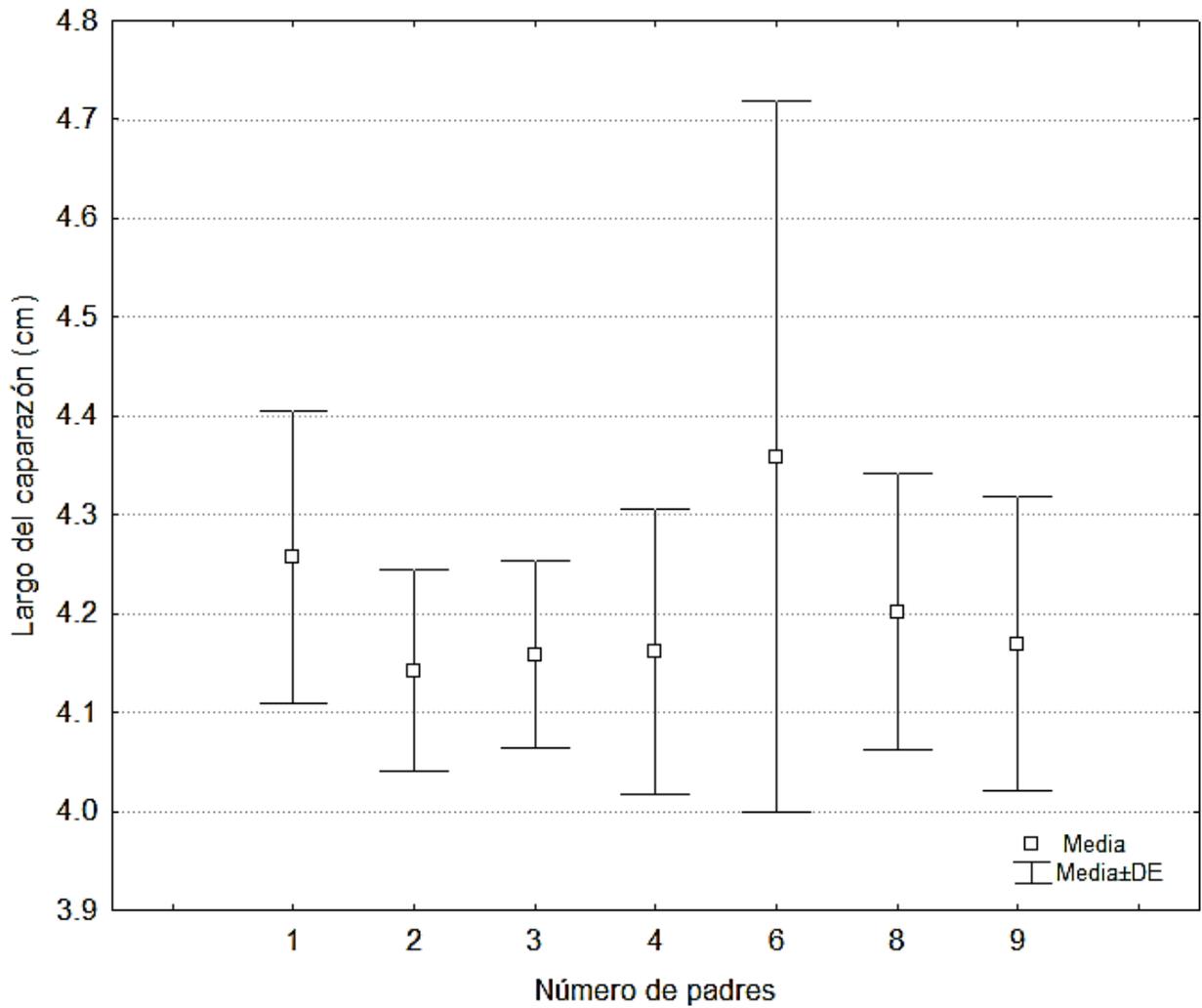


Figura 10. Variación de la media del ICr con respecto al tamaño de la puesta.

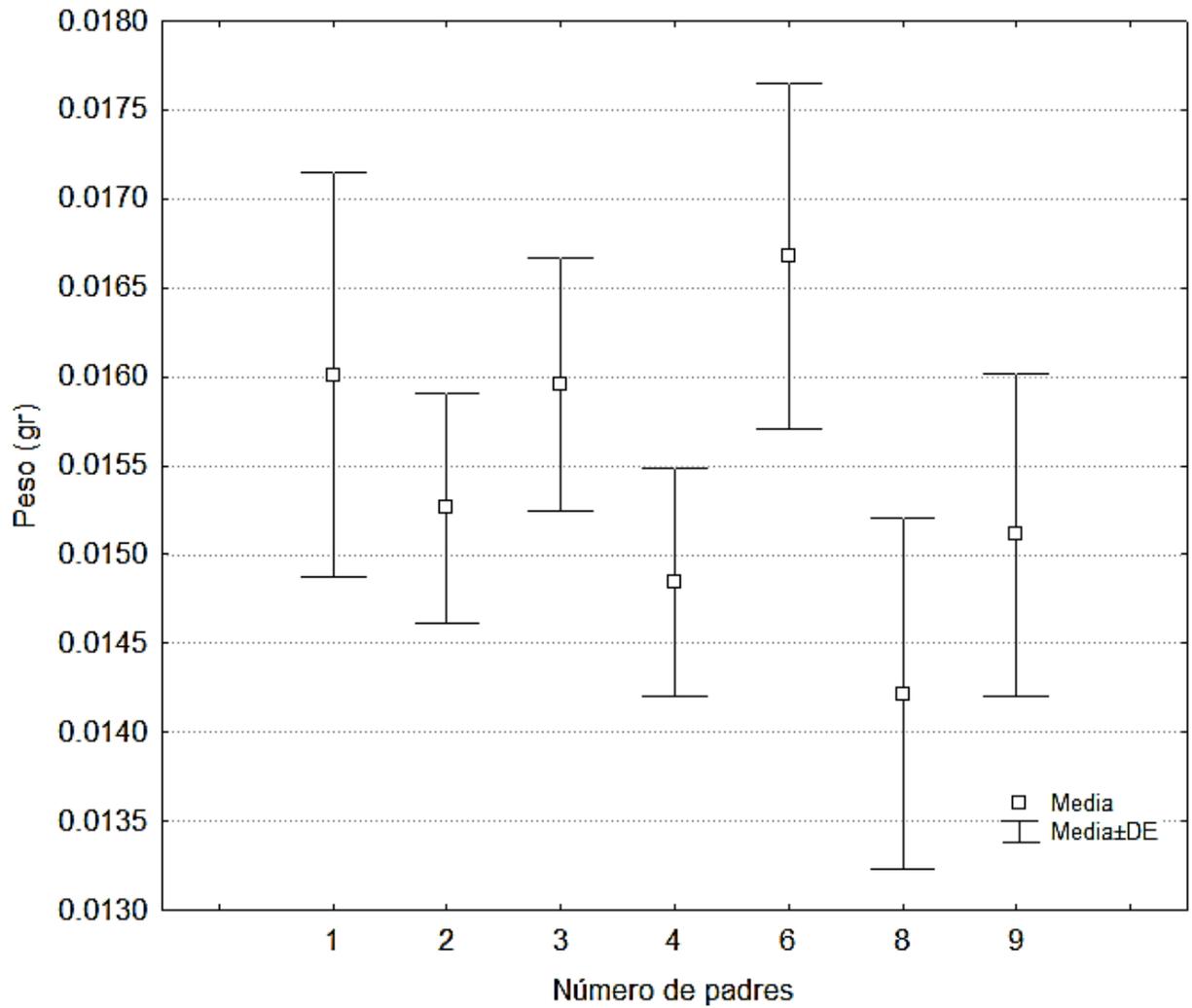


Anexo III. Diagrama de caja para representar la variación y valores promedio del largo, peso y área del caparazón según el número de padres, acorde a los resultados del análisis de PERMANOVA.



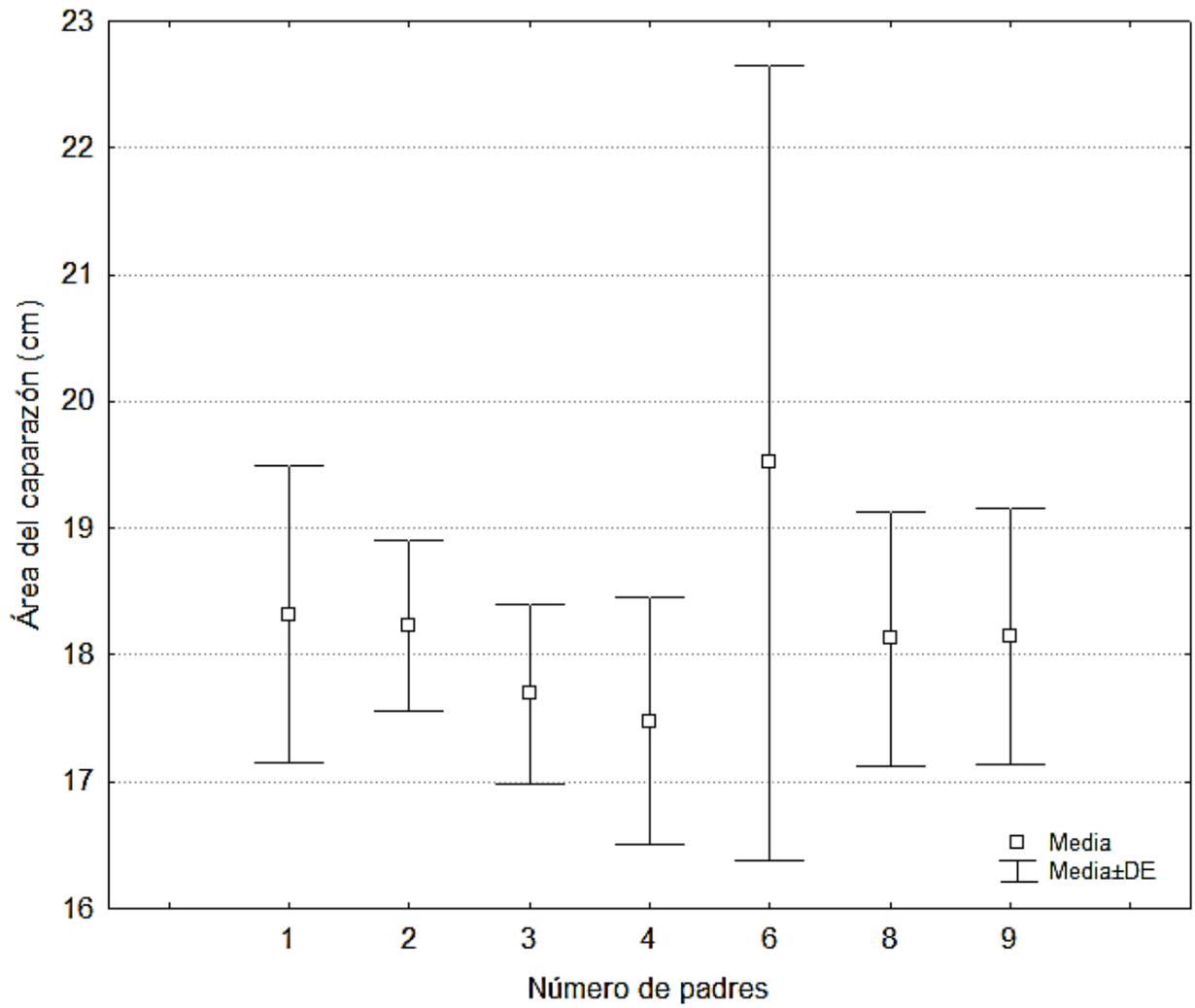
Fuente de variación	G.L.	SC	MSC	Pseudo- <i>F</i>	P	Permutaciones
PM	6	2.6E-02	4.46E-03	4.5797	0.0004	9947
Res	199	0.1938	9.74E-04			
Total	205	0.22056				





Fuente de variación	G.L.	SC	MSC	Pseudo- <i>F</i>	P	Permutaciones
PM	6	9.8E-05	1.63E-05	17.181	0.0001	9943
Res	199	1.8E-04	9.51E-07			
Total	205	2.8E-04				





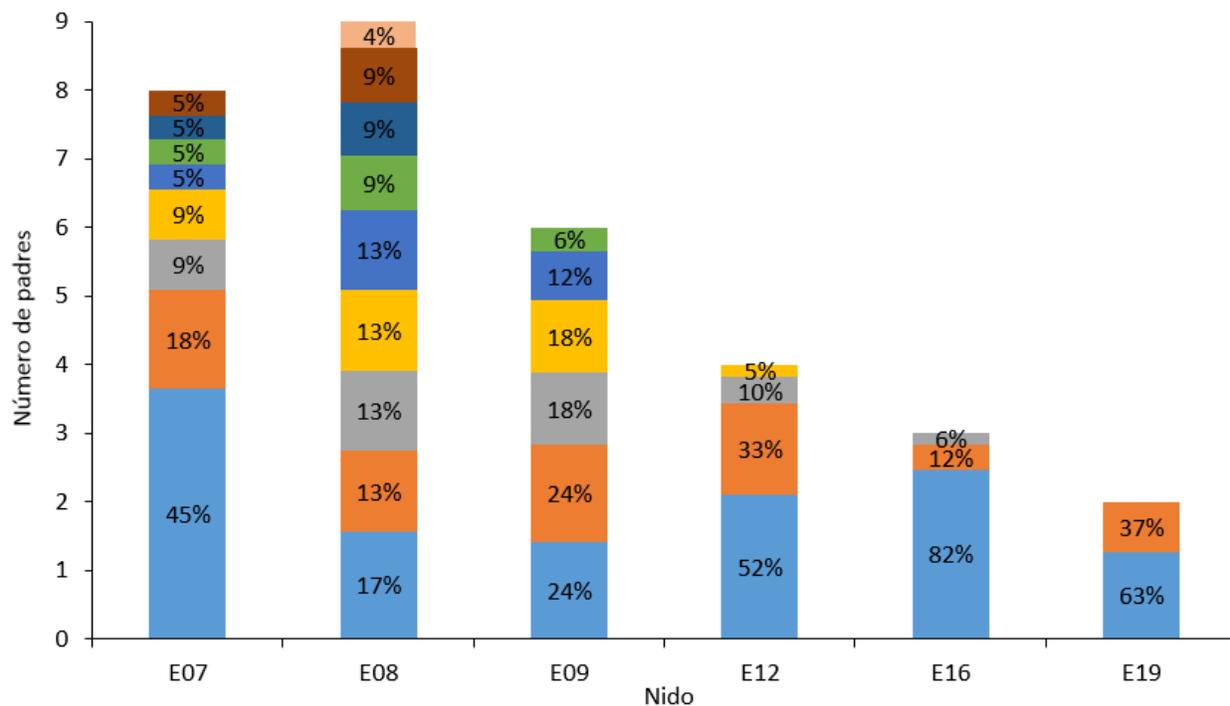
Fuente de variación	G.L.	SC	MSC	Pseudo- <i>F</i>	P	Permutaciones
PM	6	46.648	7.7746	13.747	0.0001	9955
Res	199	352.99	1.7738			
Total	205	399.64				



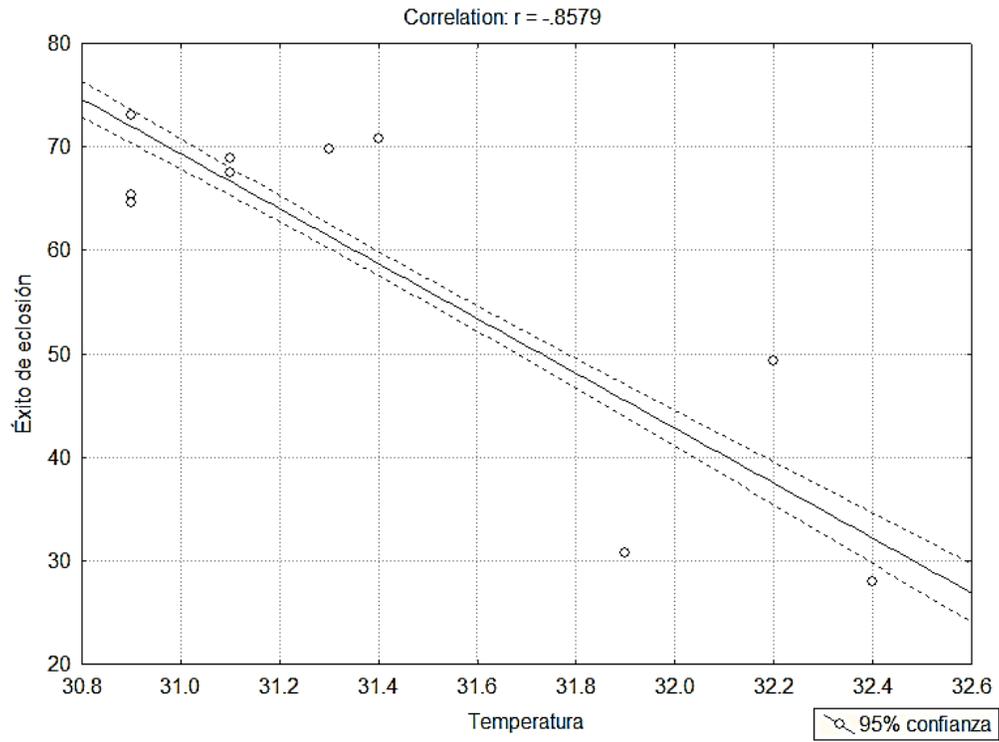
Anexo IV. Número de huevos incubados por nido.

Nido	Número de huevos
E07	109
E08	92
E09	40
E11	109
E12	101
E16	85
E17	109
E18	111
E19	87
E20	47

Anexo V. Porcentaje de fecundación de cada macho, en los seis nidos que presentan paternidad múltiple.



Anexo VI. Correlación del promedio de temperatura de incubación con el éxito de eclosión. Cada punto representa el éxito de eclosión de una nidada.



Anexo VII. Permisos de colecta expedidos por la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT, oficio SGPA/DGVS/09320/16 y Oficio No. SGPA/DGVS/04291/16.

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 09320 /16
CIUDAD DE MÉXICO, A 07 SEP 2016

M. EN C. JOSÉ ALBERTO MONTOYA MÁRQUEZ
UNIVERSIDAD DEL MAR OAXACA - PUERTO ANGELES
CIUDAD UNIVERSITARIA S/N
SAN PEDRO POCITLÁ, OAXACA
C.P. 70902 - MÉXICO
TEL. (958)84 2049, amontoya@angel.umar.mx

En atención a su solicitud de Modificación de la Licencia de Colecta Científica por Proyecto sobre especies o Poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, otorgada con el oficio Núm. SGPA/DGVS/04291/16 de fecha 04 de mayo de 2016, para realizar actividades de colecta de ejemplares de tortuga gólfina, tortuga marina escamosa del Pacífico *Lepidochelys olivacea*, en el Santuario Playa Escobilla, Municipio Santa María Tonameca, Estado de Oaxaca, inherentes al proyecto denominado "Morfometría del caparazón y su relación con aspectos reproductivos de la tortuga gólfina *Lepidochelys olivacea* en la Playa Escobilla, Oaxaca".

Al respecto y con fundamento en lo dispuesto en los artículos 27 tercer párrafo de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; 89 y 32 Bis fracción I y III y XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 19 fracción XXV y 32 fracciones VI, VIII, XG, XXV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de noviembre de 2012; en relación con los artículos 19, 80, 83, 86 y 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; 97 de la Ley General de Vida Silvestre y 125 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, esta Dirección General autoriza la siguiente Modificación a la autorización otorgada con el oficio Núm. SGPA/DGVS/04291/16:

- Se tomará muestra de sangre de 1 ml, registro del peso, macho en etapa anterior de eclosión (ambos) a las hembras (30) hembras anidadoras de tortuga gólfina, tortuga marina escamosa del Pacífico *Lepidochelys olivacea* (que se encuentran en proceso de oviposición) y su liberación inmediata en el área de colecta.
- En hasta veinticinco (25) crías de la especie "tortuga gólfina" *Lepidochelys olivacea* de cada nido recolectado e incubado en el Centro Mexicano de la Tortuga (CMT) se obtendrá muestra de su caparazón (0.5 mm) (una vez tomada la muestra, deberá realizarse la prevención correspondiente para evitar alguna infección), registro del peso, registro de pruebas de desarrollo a la luz, velocidad de caminata y velocidad de natación y su liberación inmediata.
- Se integra al grupo de colaboradores el Dr. Felipe Becerril Morales de la Universidad del Papaloapan, Cr. Valentina Iñárriz Villarejo y la M. en C. Samantha Karam, ambas de la Universidad del Mar.

continúa al reverso. / Hoja 1 de 1

An. 9584 2049, amontoya@angel.umar.mx
Delegación Miguel Alemán, C. P. 1025 México D.F.
Teléfono 5 025 5024 5000 Fax 5 025 5024 5040

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 04291 /16
CIUDAD DE MÉXICO, A 07 OCT 2016

M. EN C. JOSÉ ALBERTO MONTOYA MÁRQUEZ
UNIVERSIDAD DEL MAR OAXACA - PUERTO ANGELES
CIUDAD UNIVERSITARIA S/N
SAN PEDRO POCITLÁ, OAXACA
C.P. 70902 - MÉXICO
TEL. (958)84 2049, amontoya@angel.umar.mx

Finalmente, le notifico que este oficio deberá estar acompañado invariablemente del similar con Núm. de oficio SGPA/DGVS/04291/16 y quedo sujeto estrictamente a las condiciones establecidas en el mismo.

ATENTAMENTE
LA DIRECTORA GENERAL DE VIDA SILVESTRE
YOLANDA MORA ALANIZ PASINI

C. P. C. José Gerardo Moreno - Director General de Inspección y Vigilancia de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros.
C. P. C. Miguel Ángel Espinosa Luna - Coordinador de Inspección y Vigilancia de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros.
C. P. C. David Beltrán Gutiérrez - Director General de Monitoreo y Evaluación de Impactos en la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.
C. P. C. María Victoria González Luecas - Delegada Federal de la SEMARNAT en el Estado de Oaxaca.
C. P. C. Manuel Rodríguez Gómez - Director del Centro Mexicano de la Tortuga, Santuario Playa Escobilla - cmto@semarnat.gob.mx
C. P. C. David Beltrán Gutiérrez - Director General de Monitoreo y Evaluación de Impactos en la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.
C. P. C. David Beltrán Gutiérrez - Director General de Monitoreo y Evaluación de Impactos en la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.
C. P. C. David Beltrán Gutiérrez - Director General de Monitoreo y Evaluación de Impactos en la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.
C. P. C. David Beltrán Gutiérrez - Director General de Monitoreo y Evaluación de Impactos en la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.

MOFOP-JAER/UMAR/04291/TORTUGAS-0-16
Por medio de este oficio ecológico y es una eficiente del papel, las copias de conocimiento de este oficio de remisión vía electrónica.

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 04291 /16
MÉXICO, D. F., A 04 DE MAYO DE 2016

M. EN C. JOSÉ ALBERTO MONTOYA MÁRQUEZ
UNIVERSIDAD DEL MAR OAXACA - PUERTO ANGELES
CIUDAD UNIVERSITARIA S/N
SAN PEDRO POCITLÁ, OAXACA
C.P. 70902 - MÉXICO
TEL. (958)84 2049, amontoya@angel.umar.mx

Considerando que he dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones LIII, XX, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 19 fracción XXV y 32 fracciones VI, VIII, XG, XXV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de noviembre de 2012; 71, 60 fracción I, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 97 fracción XI, 87 y 88 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 fracción II y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 86, fracciones I y II, Artículo 105, fracciones I y II del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-505-SEMARNAT-2010, protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de especies en riesgo; la Dirección General de Vida Silvestre autoriza la Colecta Científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para realizar las siguientes actividades inherentes al Proyecto denominado "Morfometría del caparazón y su relación con aspectos reproductivos de la tortuga gólfina (*Lepidochelys olivacea*) en Playa Escobilla, Oaxaca".

- Contención de hasta treinta (30) hembras anidadoras de "tortuga gólfina, tortuga marina escamosa del Pacífico" *Lepidochelys olivacea* (que se encuentran en proceso de oviposición) únicamente para la toma de medidas morfométricas, registro fotográfico y su liberación inmediata en el área de colecta.
- Colecta de hasta treinta (30) nidadas de "tortuga gólfina, tortuga marina escamosa del Pacífico" *Lepidochelys olivacea* para su traslado e incubación en nidos artificiales en el Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Mazunte, Oaxaca hasta el momento de la eclosión, para el registro fotográfico de los neonatos vivos, evaluación del éxito de eclosión y éxito de emergencia y la liberación de los neonatos en las instalaciones del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT) a su medio natural.
- Registro de nidos eclosionados, registrando el número de neonatos, citas muertas, así como huevos que no eclosionaron.

La actividad de manejo con tortuga marina deberá realizarse de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-162-SEMARNAT-2012.

continúa al reverso. / Hoja 1 de 2

An. 9584 2049, amontoya@angel.umar.mx
Delegación Miguel Alemán, C. P. 1025 México D.F.
Teléfono 5 025 5024 5000 Fax 5 025 5024 5040

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 04291 /16
MÉXICO, D. F., A 04 DE MAYO DE 2016

M. EN C. JOSÉ ALBERTO MONTOYA MÁRQUEZ
UNIVERSIDAD DEL MAR OAXACA - PUERTO ANGELES
CIUDAD UNIVERSITARIA S/N
SAN PEDRO POCITLÁ, OAXACA
C.P. 70902 - MÉXICO
TEL. (958)84 2049, amontoya@angel.umar.mx

Las actividades de colecta se llevarán a cabo en el Santuario Playa Escobilla, Municipio Santa María Tonameca, Estado de Oaxaca. Esta autorización tendrá una vigencia de un (01) año a partir de la expedición de la presente.

Las actividades se realizarán con el Aval de la Universidad del Mar - Unidad Oaxaca, (UMAR-Oaxaca) con la colaboración del M. en C. José Alberto Montoya Márquez, Dr. Juan Francisco Meráz Herrando, Felipe Franco Castañeda, Karina Marín Lugo Trogo, Ligia Nataly Cruz Rodríguez de la Institución antes mencionada; Tania Zúliga Marroquín de la Universidad del Papaloapan (UNPA); Biol. Martha Regina Harfush Meléndez, Biol. Cuauhtémoc Penaflores Salazar, Biol. Teresa Luna, Carmelo Ambrosio Rosario, Alberto Jaramán Cruz, todos del Centro Mexicano de la Tortuga y el titular y colaboradores quedan sujetos a las siguientes condicionales:

- Deberá cumplir con las disposiciones Administrativa, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la Materia, sean Federales, Estatales o Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.
- Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo en el Área Natural Protegida, deberá contactar al Director o Encargado del Centro Mexicano de la Tortuga, lo anterior para coordinar las actividades de campo con el ANP, presentar su programa de actividades, lista de participantes y fechas en que pretende ingresar al ANP; así mismo se le asignará el personal del ANP que lo acompañará durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones, acceso y recomendaciones que le haga dicho personal.
- En la realización del proyecto propuesto, se responsabilizará al titular de la investigación de cualquier impacto significativo que resulte sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si existe algún riesgo.
- Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a la Delegación Federal de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el Estado de Oaxaca (Tel. 01 (951) 512 9600), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviándole un reporte detallado por escrito.
- Con base al Capítulo IV, Artículo 88 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa detalladamente las actividades realizadas, los resultados obtenidos, los problemas del área trabajada, las potencialidades alternativas de solución y en su oportunidad, la(s) publicación(es) y sobre otro producto de la investigación.
- Queda estrictamente prohibido efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualquiera que sea su estado, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.
 - De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 87 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento del material biológico colectado para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de observar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.





SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGA/DOVS/ 04291 /16
MÉXICO, D. F., A 04 DE MAYO DE 2016

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales Municipales cuantas veces lo soliciten. Así mismo y tomando en consideración lo establecido por el Artículo 67 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 17 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con el consentimiento previo, expreso e informado de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

DE CONFORMIDAD CON EL ARTÍCULO 2 FRACCIÓN XXIV, 32 Y 84 DEL REGLAMENTO INTERIOR DE LA SEMARNAT FIRMA EL PRESENTE, EN SUPLENENCIA POR AUSENCIA DEFINITIVA DEL C. DIRECTOR GENERAL DE VIDA SILVESTRE, LA DIRECTORA DE APROVECHAMIENTO DE LA VIDA SILVESTRE.

M.V.Z. LAURA ELENA GÓMEZ MONTES

- C.c.p. C. Joel González Moreno - Director General de Inspección y Vigilancia de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros PROFOPA, Carr. Pánuco Ajuaco No. 200, 8° Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C.P. 14210, México D.F. vida_silvestre@semarnat.gob.mx; jmg@semarnat.gob.mx
- C. Miguel Ángel Espinosa Luna - Coordinador de Asesoría de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental coordinacion.sga@semarnat.gob.mx; miguel@semarnat.gob.mx
- C. Tomás Víctor González Linares - Director General de la SEMARNAT en el Estado de Oaxaca tomasm@semarnat.gob.mx
- C. Manuel Montenegro Gómez - Director del Centro Educativo de la Tortuga, Cabaña Playa Escobedo - cmontenegro@semarnat.gob.mx
- C. David Guillermo Carbonell - Director General de Manejo para la Conservación de Áreas Naturales Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas - Carretera Pánuco Ajuaco No. 200, 6° Piso Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C. P. 14210 México, D. F. dgc@semarnat.gob.mx
- C. Fernando Sánchez Gamacho - Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies - Edificio de Vida Silvestre fsanchez@semarnat.gob.mx
- Acta de Vigencia: 09/05-12/04/16, 09/01-12/11/04/16.

LEGIMOS Y CONFORMAMOS. Cotece/Cienc. - Alberto Montoya M. - TORTUGAS-5-16

"Por una vida más ecológica y el uso eficiente del papel, las copias de conocimiento de este oficio de remiten vía electrónica".
En su lugar la por ausencia definitiva del Director General de Vida Silvestre y de conformidad con lo dispuesto en los Artículos Fracción XXIV, 32 y 84 del Reglamento Interior de la SEMARNAT, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012, suscribe la Directora de Aprovechamiento de la Vida Silvestre, previa designación hecha mediante Oficio SGA/DOVS/04133/16 de fecha 29 de abril de 2016"

Av. Ejército Nacional Número 201, Colonia Anáhuac,
Bosque de Alamos, México, C. P. 11000, México, D. F.
Teléfono 01 (55) 96-24-33-36, Fax: 01 (55) 969-04-36-42

Página 2 de 2

