

UNIVERSIDAD DEL MAR



**VARIACIÓN DE CINCO LOCI MICROSATELITALES NUCLEARES DE
TORTUGA GOLFINA *Lepidochelys olivacea* (ESCHSCHOLTZ, 1829) EN LA
ZONA REPRODUCTORA DE ESCOBILLA, OAXACA.**

Tesis que para obtener el título de Licenciado en Biología Marina, presenta:

C. Javier Pérez Robles.

PUERTO ÁNGEL, OAXACA, MEXICO

Noviembre del 2006

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biología de las tortugas marinas	1
1.2 Situación de las tortugas marinas en México	4
1.3 La tortuga golfina y su biología	6
1.3.1 Taxonomía y descripción	6
1.3.2 Alimentación	8
1.3.3 Crecimiento	8
1.3.4 Reproducción	8
1.3.5 Distribución de sus poblaciones	9
1.3.6 Migraciones	10
1.3.7 Importancia Ecológica	10
1.3.8 Importancia Económica	11
1.3.9 Principales amenazas	11
1.4 El Centro Mexicano de La Tortuga y las tortugas golfinas de Escobilla	12
1.5 Herramientas moleculares	13
1.5.1 Marcadores moleculares	13
1.5.2 Los microsatélites	14
1.5.2.1 La Reacción en Cadena de la Polimerasa	15
1.5.3 Análisis estadísticos relevantes en Genética Molecular	17
1.5.3.1 Frecuencias alélicas	17
1.5.3.2 Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg y prueba de desequilibrio por ligamiento	18
1.5.3.3 Utilidad de los microsatélites en estudios de paternidad ..	19
1.6 Antecedentes del uso de microsatélites en tortugas marinas	21
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
5. ÁREA DE ESTUDIO	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1 Material biológico	31
6.2 Extracción de ADN	31
6.3 Análisis de microsatélites	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Implementación de la PCR	35
7.2 Caracterización de la variación	39
7.2.1 Polimorfismos	40
7.2.2 Frecuencias alélicas	42
7.3 Equilibrio Hardy – Weinberg y desequilibrio por ligamiento	47
7.4 Utilidad de los microsatélites para estudios de paternidad	49
8. CONCLUSIONES	51
9. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES	53
10. LITERATURA CITADA	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Secuencias de los iniciadores microsatelitales diseñados por Aggarwal <i>et al.</i> , (2004).	32
Tabla II. Intervalos de tamaños de los alelos detectados en este estudio, y los encontrados por otros autores.	40
Tabla III. Variación de los loci analizados.	41
Tabla IV. Comparación del número de alelos para los cinco loci.	42
Tabla V. Frecuencias alélicas para los loci.	45
Tabla VI. Resultados de la prueba exacta de Fisher para el análisis de conformidad con el equilibrio Hardy – Weinberg.	47
Tabla VII. Resultados de la prueba de desequilibrio por ligamiento.	48
Tabla VII. Probabilidad de detectar paternidad múltiple con OR-2, OR-4 y OR-7.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida generalizado de las tortugas marinas, la duración de cada una de las fases varía según la especie.	2
Figura 2. Ejemplar adulto de tortuga golfita en Escobilla, Oaxaca.	7
Figura 3. Características externas principales para identificación de la tortuga golfina.	7
Figura 4. Arribada de tortugas golfitas en Escobilla, Oaxaca	9
Figura 5. Esquema de representativo de las fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	17
Figura 6. Ubicación geográfica de Escobilla, Oaxaca. Se muestran ríos aledaños, zonas urbanas y localidades de referencia.	30
Figura 7. Ejemplo de interpretación de los productos de amplificación de OR-8 para tres individuos.	33
Figura 8. Extractos de ADN total en gel de agarosa.	35
Figura 9. Prueba de optimización de temperaturas de amplificación.	36
Figura 10. Amplificación utilizando una dilución de los iniciadores de 1:100.	37
Figura 11. Prueba de optimización de temperaturas de alineamiento para el locus OR-8.	38
Figura 12. Resultados de amplificación de OR-8 para 12 individuos.	39
Figura 13. Variación encontrada para OR-7.	41
Figura 14. Distribución alélica de los cuatro loci en la población.	46

RESUMEN

La tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* es un componente importante en los ecosistemas marinos tropicales y subtropicales. Durante las últimas décadas, sus poblaciones han sido severamente diezgadas por sobreexplotación y contaminación de su hábitat, sin embargo ya se observan signos de su recuperación. Tal situación pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios orientados a evaluar su estado de conservación y definir posibles planes para su manejo. Los marcadores moleculares han mostrado ser herramientas de gran utilidad en este ámbito. Particularmente, el análisis de loci microsatelitales ha sido empleado para revelar aspectos relacionados con la biología de las tortugas golfinas, incluyendo la caracterización de su variación genética, la elucidación de sus estrategias reproductivas, y el análisis de su estructura poblacional. En este último ámbito, un aspecto deseable es que los análisis se basen en loci medianamente polimórficos. El presente trabajo tuvo como objetivo implementar mediante PCR el análisis de los loci OR-1, OR-2, OR-4, OR-7 y OR-8 en la zona reproductora de Escobilla, Oaxaca. Dichos loci han sido reportados como medianamente polimórficos en la India y Costa Rica. En este trabajo se corroboró su nivel de variabilidad intermedio, observándose alelos con tamaños similares a los reportados por otros autores. Para el caso de OR-1 se encontraron 12 alelos y una heterocigosidad observada (H_o) de 0,948, para OR-2 10 alelos y H_o de 0,701, para OR-4 16 alelos y H_o 0,870, y para OR-7 11 alelos y H_o de 0,779. Para OR-8 no se estimó H_o , ya que su variación alélica permaneció enmascarada por artefactos técnicos. Sin embargo, se obtuvo evidencia de su polimorfismo reconociéndose alrededor de 13 alelos. Los cuatro loci restantes se encontraron en equilibrio Hardy – Weinberg ($P > 0,05$), y con evidencia de ligamiento ($P < 0,05$) para los pares OR-1/OR-2, OR-1/OR-4, OR-2/OR-4, y OR-1/OR-7. Los resultados de ligamiento no concuerdan con los reportados por otros autores, posiblemente debido a diferencias en los tamaños de muestra. El análisis de utilidad para estudios de paternidad, de OR-2, OR-4 y OR-7, señaló a OR-4 como el locus más informativo y a OR-7 como el menos informativo. La probabilidad de que dos individuos elegidos al azar en la población compartan el mismo genotipo en distintos loci fue menor para el par OR-2/OR-4 ($Q = 0,0014$), y la probabilidad de detectar paternidad múltiple a través de su uso combinado de ellos fue muy alta ($D = 0,918$). El uso exclusivo de OR-2 y OR-4 permitiría realizar estudios de paternidad con un nivel de confiabilidad alto.

Palabras clave: microsátélites, tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, paternidad múltiple, Escobilla, polimorfismo, ADN microsatelital.