

# UNIVERSIDAD DEL MAR



VARIACIÓN DE MICROSATÉLITES NUCLEARES EN LA COLONIA REPRODUCTORA  
DE TORTUGAS GOLFINAS, *Lepidochelys olivacea* (ESCHSCHOLTZ, 1829),  
DE ESCOBILLA, OAXACA.

TESIS PRESENTADA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA  
UNIVERSIDAD DEL MAR, COMO REQUISITO NECESARIO PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS, CON ESPECIALIDAD  
EN ECOLOGÍA MARINA.

SAMANTHA GABRIELA KARAM MARTÍNEZ  
ABRIL DE 2004



## RESUMEN

La captura comercial mundial de tortugas marinas en las décadas de los 60s y 70s, recayó sobre las poblaciones de tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, debido a su abundancia relativa, provocando la desaparición de algunas colonias de anidación y mermando otras. Es por este motivo, que la tortuga golfina está considerada como especie bajo condición especial dentro de una variedad de instrumentos legales enmarcados en tratados de conservación con alcances regionales e internacionales. En México, las poblaciones de tortugas golfinas muestran una tendencia de recuperación, destacando el caso de Escobilla, Oaxaca, en donde se ha observado un incremento sostenido en el número de anidaciones por año. Ante la posible reapertura de la explotación de esta colonia anidadora particular, se pone de manifiesto la necesidad urgente de realizar mayor investigación sobre ella, con el propósito de apoyar posibles planes para su manejo. En este sentido, los avances en genética molecular han proporcionado herramientas para apoyar la conservación de recursos biológicos. Con el fin de identificar marcadores moleculares que permitan estudiar los sistemas de apareamiento de la tortuga golfina, se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) los microsatélites Cm72, Cm84, Cc117, Ei8, LB107, LB121, LB142 y LB143, en la colonia reproductora de esta especie en la playa de La Escobilla, Oaxaca. Los resultados mostraron diversos grados de variación, desde loci monomórficos (LB121 y LB142), hasta altamente variables (como Cm84 con 20 alelos y Ei8 con 29 alelos y una heterocigosidad observada de 0.92 y 0.96, respectivamente). Se encontró que uno de los loci (LB143) no está en equilibrio Hardy-Weinberg en la población ( $P < 0.05$ ), mientras que Cm72, Cm84 y Ei8, sí lo están ( $P > 0.05$ ); por otro lado, no se encontró evidencia de ligamiento entre ellos ( $P > 0.05$ ). El análisis de la utilidad de estos últimos tres loci para estudios de paternidad, reveló que Cm72 aporta poca información. En este sentido, exclusivamente Cm84 y Ei8 resultaron útiles para realizar estudios de paternidad en esta colonia anidadora de tortugas golfinas, en términos de la probabilidad estimada de que dos individuos elegidos al azar de la población compartan el mismo genotipo en los dos loci,  $Q < 0.000$ ; y de la probabilidad de detectar paternidad múltiple a través del uso combinado de ellos,  $D = 0.98$ . Desafortunadamente, debido a un inconveniente técnico, la interpretación de los resultados de Ei8 es problemática, por lo que, en balance, no se puede considerar útil para trabajos de precisión.

**Palabras clave:** variación genética, microsatélites, tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, Escobilla, paternidad múltiple.

## ABSTRACT

The global sea turtle commercial catch in the 60s and 70s was based on olive ridleys, *Lepidochelys olivacea*, because of its relative abundance and this is the reason why some rookeries disappeared altogether while others declined considerably. Since then, olive ridleys have been considered endangered species in a variety of legal instruments framed by conservation treaties of regional and international scope. In Mexico, olive ridley populations, after decades of official protection are now demonstrating a trend towards recovery, all the more significant in Escobilla where the number of nests per year has increased steadily from the early 90s. For this reason, there is a latent possibility of allowed exploitation of this particular rookery. This emphasizes the urgent necessity of research that can provide a scientific basis to management plans. In this sense, molecular genetics advances have provided tools that help the conservation of biological resources. With a primary objective of evaluating useful molecular markers for the study of olive ridley mating systems, the microsatellites Cm72, Cm84, Cc117, Ei8, LB107, LB121, LB142 and LB143 were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) on tissue samples from the rookery nesting at Escobilla, Oaxaca, Mexico. These microsatellites showed diverse variation levels, from monomorphic loci (LB121 and LB142), to highly variable (e.g., Cm84 with 20 alleles and Ei8 with 29 alleles, and an observed heterozygosity of 0.92 and 0.96, respectively). One locus (LB143) exhibited deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in the population ( $P < 0.05$ ), while Cm72, Cm84 y Ei8, were within expectations ( $P > 0.05$ ). There was no evidence of linkage disequilibrium between the latter group of loci ( $P > 0.05$ ). The analysis of the usefulness for paternity studies of these three loci, proved that Cm72 is barely informative. In this sense, only Cm84 and Ei8 proved to be useful for paternity studies in this olive ridley rookery, in terms of the probability that two unrelated individuals in the population share the same genotype in the two loci,  $Q < 0.000$ ; and the probability of detecting multiple paternity with the set of loci,  $D = 0.98$ . Unfortunately, due to a technical inconvenient, the interpretation of the results for Ei8 is problematic and, on balance, cannot be considered useful for precision studies.

**Key words:** genetic variation, microsatellites, olive ridley, *Lepidochelys olivacea*, Escobilla, multiple paternity.

*Esta te la dedico a ti  
Mamá, por toda tu ayuda...*

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Biól. Javier Vasconcelos, a los investigadores y al personal técnico del Centro Mexicano de la Tortuga. En particular a Luis García, quien es especialmente hábil trabajando con tortugas en el campo. De la misma manera agradezco a Tania Zúñiga y al personal de apoyo de la Universidad del Mar, en especial a Heladio Espíndola y Andrés Pacheco, por su cooperación en la colecta de muestras.

Agradezco también al Dr. Alberto Abreu, director del Laboratorio de Genética de la Unidad Académica Mazatlán, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM, por brindarme entrenamiento inicial en las técnicas de laboratorio y por compartirme iniciadores. Asimismo, agradezco al Dr. Peter Dutton de la Universidad de California en San Diego, por permitirme utilizar algunos de sus iniciadores para tortugas laúd.

Adicionalmente deseo reconocer el apoyo en el trabajo de laboratorio de la Biól. Mar. Tania Zúñiga y del p. de Biól. Mar. Santiago Ramos, así como la constante disposición y ayuda del Biól. Adrián Ramírez, gracias a quien, el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar esté siempre en las condiciones ideales para el trabajo. Asimismo, deseo agradecer al Dr. Manuel Uribe del ICMYL, UNAM y sus estudiantes, por las facilidades prestadas para el procesamiento de algunas muestras.

De manera muy especial, reitero mi agradecimiento por la dirección de este trabajo al Dr. Alberto Abreu; al Dr. Rolando Cardeña, por sus invaluable enseñanzas y porque su intervención fue un factor determinante para la culminación de este trabajo; y al M.C. Alberto Montoya, por sus valiosas sugerencias al escrito final.

Gracias a Luis, Gabriela y Ana Paula por comprender y tolerar mis ausencias, y a mi madre por darles a mis hijas, con cariño, los cuidados que yo no les di mientras hacía este trabajo.

## **RECONOCIMIENTOS**

Esta investigación se realizó con el financiamiento inicial de la Universidad del Mar y el Centro Mexicano de la Tortuga. El término de la misma fue posible gracias al financiamiento del Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) a través del proyecto UMAR-PTC-7 dirigido por el Dr. Rolando Cardeña López.





## CONTENIDO

	página
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> -----	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> -----	iv
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>Las tortugas marinas</b> -----	1
<i>Situación actual de las tortugas marinas en el mundo</i> -----	1
<i>Estado de las tortugas marinas en México: de la sobreexplotación a la conservación</i> -----	2
<i>Avances en el conocimiento de las tortugas marinas por medio de la aplicación de marcadores moleculares</i> -----	4
<i>¿Qué son los microsatélites?</i> -----	6
<u>Antecedentes de estudio de tortugas marinas con microsatélites</u> -----	8
<b>La tortuga golfinia, <i>Lepidochelys olivacea</i> (Eschscholtz, 1829)</b> -----	11
<i>Las tortugas golfinas de Escobilla</i> -----	13
<i>Avances en el conocimiento de las tortugas golfinas mediante el uso de técnicas moleculares</i> -----	14
<u>Sistemática</u> -----	14
<u>Filogeografía</u> -----	15
<u>Estructura poblacional</u> -----	16
<u>Antecedentes de estudio con microsatélites</u> -----	17
<b>OBJETIVOS</b> -----	21
<b>ÁREA DE ESTUDIO</b> -----	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<u>Colecta de muestras y extracción de ADN</u> -----	23
<u>Análisis de microsatélites</u> -----	23
<u>Análisis estadístico</u> -----	25

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<u>Loci amplificados</u> -----	29
<u>Polimorfismo</u> -----	30
<u>Frecuencias alélicas</u> -----	34
<u>Equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento</u> -----	37
<u>Utilidad de los microsatélites analizados para estudios de paternidad</u> -----	40
<b>CONCLUSIONES</b> -----	42
<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES</b> -----	44
<b>ANEXO 1. PROTOCOLOS DE LABORATORIO</b>	
<u>Extracción y preservación de sangre de tortugas marinas</u> -----	47
<u>Protocolo de aislamiento de ADN total a partir de muestras de sangre preservadas en amortiguador lítico</u> -----	49
<u>Protocolo de electroforesis de secuenciación en geles de poliacrilamida al 5%</u> -----	51
<u>Protocolo de tinción con nitrato de plata</u> -----	52
<u>Estimación del tamaño de los fragmentos amplificados, ejemplo del locus LB121</u> -----	54
<b>ANEXO 2. FORMATO DE INGRESO DE DATOS A ARLEQUIN 2.00</b> -----	55
<b>LITERATURA CITADA</b> -----	57

## ÍNDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Variabilidad genética de microsatélites en tortugas golfinas.	20
Tabla 2. Secuencias de los iniciadores para algunos de los microsatélites analizados.	24
Tabla 3. Variación detectada en los loci analizados.	32
Tabla 4. Frecuencias alélicas en LB143, Cm72, Cm84 y Ei8	35
Tabla 5. Resultados de la prueba de conformidad con el equilibrio Hardy-Weinberg.	37
Tabla 6. Resultados de la prueba de desequilibrio por ligamiento.	39
Tabla 7. Resumen de resultados en las diferentes fases del análisis.	40
Tabla 8. Probabilidad de detectar paternidad múltiple con Cm72, Cm84 y Ei8.	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Hembra adulta de tortuga golfina.	12
Figura 2. Pareja de tortugas golfinas apareándose.	12
Figura 3. Ubicación geográfica de Escobilla, Oaxaca.	22
Figura 4. Interpretación de los productos de PCR de Cm84 de tres individuos.	25
Figura 5. Productos de amplificación de Cc117.	29
Figura 6. Ejemplo de un locus monomórfico.	31
Figura 7. Gran variabilidad detectada en Cm84.	31
Figura 8. Distribución alélica de los cuatro loci en la población.	36
Figura 9. Productos de amplificación de Ei8 en dos individuos heterocigotos.	38
Figura 10. Extracción de sangre a partir del seno cervical dorsal.	48
Figura 11. Ejemplo de la estimación del tamaño de los alelos.	54

## INTRODUCCIÓN

### Las tortugas marinas

El Orden Testudines (todas las tortugas terrestres, dulceacuícolas y marinas) inició su evolución en el periodo Triásico, a principios del Mesozoico, hace por lo menos 200 millones de años, antes de que los grandes reptiles acuáticos, terrestres y voladores, alcanzaran su máximo esplendor (Márquez, 1996). Las tortugas marinas aparecieron hace aproximadamente 135 millones de años, evolucionando a partir de las tortugas terrestres. Junto con las iguanas y serpientes, son los únicos reptiles adaptados al medio marino que han sobrevivido. A lo largo de las eras geológicas, el número de especies de tortugas marinas ha fluctuado grandemente, siendo en algunos tiempos un grupo muy diverso. Las especies actuales (pertenecientes a las familias Cheloniidae y Dermochelyidae) se originaron en la primera parte del Eoceno al Pleistoceno (hace 60 a 10 millones de años), éstas son: *Dermochelys coriacea* (laúd); *Natator depressus* (kikila); *Chelonia mydas* (verde); *Chelonia agassizi* (prieta); *Caretta caretta* (caguama); *Eretmochelys imbricata* (carey); *Lepidochelys kempii* (lora); y *Lepidochelys olivacea* (golfina) (Márquez, 1990).

Este grupo de quelonios es un importante componente de los ecosistemas marinos, en primera instancia de los tropicales, en un menor grado de los subtropicales, e incluso de aguas muy frías (en el caso de la tortuga laúd). A pesar de la escasez contemporánea de especies dentro del grupo, las tortugas marinas no son un grupo relictivo. Tienen gran valor económico y son extremadamente vulnerables a la acción del hombre. Su inclusión en la mayoría de las listas de especies amenazadas o en peligro de extinción es un reflejo de la sobreexplotación de décadas pasadas y la necesidad actual de mejores planteamientos de manejo (Pritchard, 1997).

### *Situación actual de las tortugas marinas en el mundo*

Hasta los siglos XVIII y XIX, las tortugas marinas fueron muy abundantes en sus áreas de distribución. El tamaño de algunas poblaciones llegó a conformarse por millones de

individuos. Hoy, en cambio, son escasas las poblaciones de tortugas marinas libres del deterioro antropogénico. Una combinación particular de factores como la sobre pesca comercial, la captura incidental, la destrucción de hábitats críticos de alimentación, de anidación y de reposo y, más recientemente, la contaminación de los mares, han determinado la condición actual de las tortugas marinas. En los últimos doscientos años, la capacidad de estas especies para mantener su viabilidad se ha visto diezmada drásticamente. La mayoría se encuentran en declinación, frecuentemente a niveles críticos, y muchas poblaciones ya se extinguieron (Grupo de Especialistas de Tortugas Marinas [GETM], 1995).

Todas las especies (excepto la kikila, endémica de Australia) están catalogadas como en peligro o vulnerables en la última Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y en las listas de los Apéndices I y II de la Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres (CEM, también conocida como la Convención de Bonn). Sin excepción de ninguna especie, las tortugas marinas también están consideradas en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, por sus siglas en inglés) (GETM, 1995).

En su Estrategia Mundial para la Conservación de las Tortugas Marinas (1995), el GETM indica dentro de las estrategias de investigación y monitoreo, que existen muchos vacíos en nuestro conocimiento sobre la dinámica poblacional, historias de vida y amenazas de este conjunto de especies, atenuando el impacto de las actividades para su conservación. Señalan que para impedir la toma de decisiones inapropiadas, se requiere amplia información generada a través de la investigación.

#### *Estado de las tortugas marinas en México: de la sobreexplotación a la conservación*

En México, habitan siete de las ocho especies actuales de tortugas marinas, en áreas de alimentación como el Golfo de California, y en áreas de anidación distribuidas a lo largo de las costas del Pacífico, Golfo de México y Mar Caribe (Márquez, 1996).

Hasta 1959, las tortugas marinas eran capturadas principalmente por pescadores ribereños para autoconsumo. En esos años hubo un desarrollo industrial incipiente fomentado principalmente por extranjeros, las capturas máximas por año apenas rebasaron las 600 toneladas, obtenidas principalmente en el litoral del Golfo de México y Mar Caribe. Al comienzo de la década de 1960, se generalizó el interés comercial por las tortugas marinas, básicamente por su piel (obtenida primordialmente de tortugas golfinas) y por su caparazón (en el caso de las tortugas carey), fomentándose el desarrollo de esta pesquería. En el año de 1962, la captura total en México había rebasado las 1,400 toneladas, en 1968 la captura nacional se elevó hasta 15,000 toneladas. Durante esa etapa, por su elevada abundancia con respecto a otras especies, las capturas recayeron básicamente sobre las poblaciones de tortugas golfinas en el litoral del Pacífico Mexicano. A partir de 1969 los efectos de tan elevada captura, aunados al lento crecimiento de las poblaciones de este grupo de especies, provocaron que la pesquería disminuyera casi un tercio del volumen alcanzado en 1968, declinación que continuó en los años sucesivos (Márquez *et al.*, 1990).

Ante este panorama, las autoridades mexicanas decretaron una veda total durante la segunda mitad de 1971, y los años de 1972 y 1973, con el objetivo de reorganizar la pesquería. Tras la veda se estableció un sistema de pesca por cuotas que pretendía estabilizar la captura en 100,000 ejemplares anuales, permitida sólo a pescadores organizados en cooperativas que tuvieran el compromiso de hacer un uso integral del recurso. A pesar de las medidas, las poblaciones de tortugas marinas en México continuaron disminuyendo (Márquez *et al.*, 1990).

El gobierno mexicano ha realizado varias acciones desde entonces (ver Instituto Nacional de Ecología [INE], 1999), entre ellas sobresale que en 1986, 16 playas de anidación fueron decretadas como Reservas Naturales; en 1990 se decretó una veda total e indefinida para todas las especies de tortugas marinas (Diario Oficial de la Federación, 1990); en 1994 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, en la que se determina que las siete especies de tortugas marinas son especies en peligro de extinción (Diario Oficial de la Federación, 1994); en 1998 se firmó y en 1999 se ratificó la Convención Interamericana para la Protección

y Conservación de las Tortugas Marinas, surgida en 1996; y se han mantenido programas continuos de conservación e investigación en las principales zonas de anidación.

Hace ya más de tres décadas que en México se han impulsado actividades dirigidas a la conservación, protección e investigación de las tortugas marinas, con el fin de entender su biología, movimientos migratorios, conocer las densidades poblacionales en los sitios de anidación y la caracterización genética de las poblaciones, esto con el fin de delimitar unidades de manejo bajo las cuales es necesario aplicar las estrategias para su recuperación. El resultado de estas acciones ha sido una tendencia hacia la recuperación de las tortugas golfinas, lora y carey (INE, 1999). Las consecuencias de estas acciones son estimulantes, y resaltan la importancia de continuar con la investigación, el monitoreo y la protección en las principales zonas de anidación del país.

*Avances en el conocimiento de las tortugas marinas por medio de la aplicación de marcadores moleculares*

El desarrollo de técnicas moleculares en las últimas décadas ha permitido, a científicos y administradores de los recursos biológicos, responder a una gran variedad de preguntas orientadas hacia la conservación. Un ejemplo claro de ello lo constituyen las tortugas marinas, organismos difíciles de estudiar a lo largo de su ciclo de vida, y alrededor de los cuales, se mantenían muchas preguntas. La incorporación de la genética molecular en el estudio de este grupo de quelonios ha resultado revolucionaria, permitiendo conocer diversos aspectos sobre su historia evolutiva, filogeografía, conducta migratoria, estructura poblacional y sistemas de apareamiento (Bowen y Karl, 1997). A continuación se citan algunos de estos trabajos.

Bowen *et al.* (1991) hicieron la primera aportación en este ámbito, realizando un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs por sus siglas en inglés) del ADN mitocondrial, con el objetivo de elucidar las relaciones filogenéticas de las especies del género *Lepidochelys*.



En 1992, Bowen *et al.* investigaron la estructura poblacional global y la historia natural de la tortuga verde utilizando RFLPs de ADN mitocondrial, encontrando una división filogenética entre las tortugas verdes del Atlántico-Mediterráneo y las del Indo Pacífico, además de una subestructura poblacional geográfica asociada con cada cuenca oceánica.

Bowen *et al.* (1993), realizaron un estudio con RFLPs de ADN mitocondrial con el fin de analizar la estructura de las poblaciones del Atlántico Nororiental y Mar Mediterráneo de la tortuga caguama. Sus resultados sugirieron que existe limitación en el flujo génico contemporáneo entre poblaciones regionales, sustentando la hipótesis de que las hembras tienden a anidar en sus playas natales. Los autores puntualizaron que las poblaciones anidadoras estudiadas deben ser manejadas como unidades taxonómicas independientes.

En 1995, Bowen *et al.*, mediante la secuenciación de la región control del ADN mitocondrial<sup>1</sup>, demostraron que las tortugas caguamas juveniles que se agregan para alimentarse cerca de Baja California, tienen origen en las colonias reproductoras de las playas japonesas.

En 1996, Bowen *et al.* estimaron la contribución de las colonias anidadoras de tortuga carey del Caribe a la zona de alimentación de Isla Mona, Puerto Rico, por medio de secuencias de la región control del ADN mitocondrial. Sus resultados mostraron que en esta zona de alimentación no sólo se congregan individuos de las zonas de anidación vecinas, sino individuos provenientes de toda la región del Caribe.

Ese mismo año, Bass *et al.* estudiaron el comportamiento reproductivo-migratorio y la estructura poblacional de la tortuga carey en el Caribe, por medio de secuencias de la región control del ADN mitocondrial. Encontraron linajes matriarcales<sup>2</sup> altamente estructurados entre las colonias de anidación, lo cual soporta la hipótesis de fidelidad a la playa de nacimiento (filopatría) por impronta (memorización de características de la playa de anidación en el recorrido que hacen las crías recién nacidas desde el nido, hacia el mar).

---

<sup>1</sup> La región control del ADN mitocondrial es altamente variable, por lo que se le considera útil para el análisis filogenético intraespecífico, para el estudio fino de la estructura poblacional y para la identificación del origen natal de algunos individuos (Abreu-Grobois *et al.*, 1996).

<sup>2</sup> El ADN mitocondrial es heredado únicamente por vía materna (Brown *et al.*, 1979)

Los datos de ADN mitocondrial han demostrado en las tortugas verde, caguama y carey, una fuerte estructura genética entre colonias anidadoras regionales. Estos datos son consistentes con la filopatria y refuerzan el concepto de que las colonias anidadoras constituyen unidades fundamentales de manejo. Actualmente se está utilizando el análisis de regiones de ADN nuclear con mayor tasa de mutación, como los microsatélites, para elucidar la estructura poblacional a escalas geográficas más finas, conocer el papel de los machos en el flujo génico, y el estudio de los sistemas de apareamiento (FitzSimmons, 1998; Kichler *et al.*, 1999; López-Chávez, 2000; Crim *et al.*, 2002; Moore y Ball, 2002).

### *¿Qué son los microsatélites?*

Se conoce como ADN satelital al ADN de los organismos eucarióticos que contiene secuencias repetidas una y otra vez, como en un tartamudeo genético, estas secuencias están constituidas por varias combinaciones de las cuatro bases nucleotídicas –adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T)- (Moxon y Wills, 1999).

El ADN satelital fue identificado por primera vez en la década de 1960. Un grupo de investigadores descubrió que al centrifugar ADN bajo ciertas condiciones, se separaban dos capas: una banda principal que contenía a los genes, y una serie de bandas secundarias a las que denominaron bandas satelitales. Se observó que estas bandas satelitales estaban compuestas de secuencias de ADN muy largas, repetidas una tras otra. En 1985 se encontraron otras regiones de ADN repetitivo más cortas y fueron llamadas minisatélites, estas regiones estaban compuestas de unidades de repetición de 15 o más pares de bases. Hacia el final de la década de 1980, un grupo de científicos aisló satélites constituidos de repeticiones de ADN todavía más cortas, y les llamaron microsatélites (Moxon y Wills, 1999).

Los microsatélites son iteraciones de pequeños grupos de nucleótidos, con longitudes de hasta seis pares de bases. Se les ha dado una variedad de nombres diferentes, tales como repeticiones de secuencias simples (SSR por sus siglas en inglés) y secuencias cortas en

tándem (STR por sus siglas en inglés). Hoy en día el término microsatélite es el más común, y es apropiado adoptarlo como término de uso general (Hancock, 1999).

Los microsatélites son altamente polimórficos (varían en el número de repeticiones de la unidad básica), con una heterocigosidad media esperada por arriba del 50% en general (Jarne y Lagoda, 1996). La causa de su enorme variabilidad, es su propensión a los errores durante la replicación, generalmente a través de un mal emparejamiento de las cadenas de ADN debido al deslizamiento de una de ellas, la cual se empareja con la unidad repetitiva equivocada de la otra cadena. Este deslizamiento causa que la ADN polimerasa añada o suprima una o más copias de la unidad repetitiva de la nueva cadena de ADN (Moxon y Wills, 1999). También se ha sugerido que la recombinación puede cambiar la longitud de los microsatélites por emparejamiento desigual o conversión génica (Li *et al.*, 2002).

En la literatura se reflejan las controversias acerca de los patrones evolutivos de los microsatélites, la mayoría de los autores los consideran como marcadores neutrales, aunque recientemente se ha recabado evidencia que demuestra que su distribución en el genoma no es azarosa y que existen microsatélites funcionalmente importantes para la organización de la cromatina, la regulación de la actividad genética, la recombinación, la replicación del ADN, el ciclo celular, los sistemas de reparación, etc. Es por ello que se debe ser cuidadoso al explicar la diversidad microsatelital en términos de la evolución neutral, sin probar críticamente esta hipótesis en contra de alternativas no neutralistas (Li *et al.*, 2002).

Con el surgimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en la década de 1980 (Saiki *et al.*, 1988), se encontró que los microsatélites pueden ser los marcadores mendelianos con mayor capacidad de resolución, y desde entonces, se han utilizado para investigaciones de parentesco y para estudios de estructura poblacional (Jarne y Lagoda, 1996). Los microsatélites pueden ser caracterizados mediante la exploración de bases de datos genómicas en aquellos organismos en los que se haya llevado al cabo mapeo o secuenciación. En los organismos en los que existe poca información a nivel de secuencia, se pueden caracterizar directamente a través de fases de clonación, detección de los microsatélites y secuenciación, todo ello para determinar las secuencias que flanquean al

microsatélite y que pueden ser utilizadas para diseñar cebadores (iniciadores de la PCR) específicos para ese locus (Jarne y Lagoda, 1996).

#### Antecedentes de estudio de tortugas marinas con microsatélites

FitzSimmons *et al.* (1995) aislaron seis microsatélites CA/GT a partir de bibliotecas genómicas preparadas para tres especies de tortugas marinas: tortuga verde, carey y caguama. La identificación de los microsatélites se llevó al cabo mediante hibridación con sondas sintéticas (dA-dC)<sub>n</sub> –(dG-dT)<sub>n</sub>; el ADN ligado se aisló de los clones positivos y se secuenció para lograr el diseño de iniciadores de 24 pares de bases con ayuda de un software. Los autores encontraron loci homólogos en todas las especies de tortugas marinas (familias Cheloniidae y Dermochelyidae), así como en una especie de tortuga de agua dulce (familia Emydidae), indicando que las secuencias que flanquean a estos microsatélites están conservadas en grupos que divergieron hace 300 millones de años. El uso de estos microsatélites ha confirmado su conveniencia para el estudio de la variabilidad genética, almacenamiento espermático, identificación de stocks, estructura poblacional y sistemas de apareamiento en diferentes especies de tortugas marinas (Dutton, 1996; FitzSimmons, 1996; FitzSimmons, 1998; Kichler *et al.*, 1999; Bollmer *et al.*, 1999; López-Chávez, 2000; Crim *et al.*, 2002; Hoekert *et al.*, 2002; Moore y Ball, 2002).

La mayoría de los estudios de estructura poblacional de tortugas marinas se habían realizado con secuencias de la región control del ADN mitocondrial, limitando los análisis a líneas maternas y a variabilidad genética moderada. El trabajo de FitzSimmons *et al.* (1995) mostró que la distribución de la variación genética de microsatélites entre poblaciones indicaría el flujo génico mediado por machos al compararla con la variación en el ADN mitocondrial. En 1996, FitzSimmons *et al.* compararon datos de ADN mitocondrial y microsatélites en poblaciones australianas de tortugas verdes, caguamas y kikilas. Encontraron que las poblaciones regionales de tortugas verdes mantienen su identidad como poblaciones divergentes, incluso cuando se toma en cuenta el flujo génico mediado por machos; en las tortugas caguama y kikila, los microsatélites dan una visión más reciente de divergencia poblacional que probablemente suceda dentro de una escala de tiempo ecológico. Estos

autores opinan que el uso de microsátélites no sólo ofrece perspectivas acerca del flujo génico mediado por machos, sino que además permite identificar divergencia poblacional cuando la variabilidad de las secuencias en el ADN mitocondrial está limitada.

Peare y Parker (1996) realizaron un estudio de estructura genética local dentro de dos playas de anidación de tortugas verdes (Tortuguero, Costa Rica y Melbourne, Florida), a través de un análisis multilocus de huellas moleculares (fingerprinting en inglés) con minisátélites identificados mediante hibridación con la sonda 33.15 de Jeffreys *et al.* (1985 en Peare y Parker, 1996). Los resultados mostraron estructura genética microgeográfica en Tortuguero, mas no en Melbourne.

FitzSimmons (1998) realizó un estudio de paternidad mediante el análisis de microsátélites en una colonia australiana de tortugas verdes. El uso conjunto de seis loci (con un intervalo de 10 a 40 alelos por locus) dio una probabilidad de detectar paternidad múltiple de 99.9%. La autora encontró que sólo dos de 22 nidadas fueron fecundadas por más de un padre, y de éstas, sólo una baja proporción de los huevos fueron fecundados por un macho secundario. Adicionalmente, el análisis de la progenie proveniente de nidadas consecutivas de algunas hembras<sup>3</sup>, sugirió almacenamiento espermático.

Bollmer *et al.* (1999) realizaron un estudio similar en una colonia anidadora de tortugas caguamas de Melbourne, Florida, utilizando dos microsátélites. A través de un análisis de máxima probabilidad concluyeron que una de tres nidadas fue fertilizada por más de un macho. Moore y Ball (2002) usaron otros microsátélites para estudiar la estructura poblacional fina y ampliar el conocimiento sobre paternidad de las tortugas caguamas de la misma zona de Florida. Encontraron que no hay diferenciación poblacional fina entre las dos localidades analizadas (separadas por ocho kilómetros); y que 22 de 70 nidadas fueron fecundadas por más de un padre, seis de ellas, por más de dos padres, constituyendo el primer reporte de más de dos padres fecundando una nidada de tortugas marinas.

---

<sup>3</sup> Las tortugas verdes depositan en promedio 2.6 nidadas en una temporada de anidación; mientras que las tortugas laúd un promedio de 5.5 nidadas (Márquez, 1996).

Dutton *et al.* (2000) llevaron al cabo un análisis de paternidad en tortugas laúd en Saint Croix (Islas Vírgenes) utilizando seis microsatélites, que en conjunto proporcionaron una probabilidad de detectar paternidad múltiple de 99%. En una serie de tres a cinco nidadas depositadas por cuatro hembras, no encontraron evidencia alguna de fecundación por más de un macho.

Por su lado, Crim *et al.* (2002) realizaron un análisis similar en las tortugas laúd que anidan en Playa Grande, Costa Rica. A través del análisis de tres microsatélites obtuvieron una probabilidad de que dos individuos elegidos al azar compartieran el mismo genotipo de 0.27% y una probabilidad de detectar paternidad múltiple de 85%. Los autores descubrieron que 31 de 50 nidadas (correspondientes a 20 hembras) habían sido fertilizadas por más de un padre; las nidadas consecutivas de cada hembra contenían la misma contribución alélica paterna indicando almacenamiento espermático o monogamia. Ninguna de las 20 hembras compartió el mismo genotipo en los tres loci, sin embargo, entre los 17 genotipos paternos inferidos, se encontraron dos casos de genotipos compartidos. Los autores concluyeron que tanto la poliandria como la poliginia, son parte de la estructura de apareamiento de esta población de tortugas laúd.

Kichler *et al.* (1999) llevaron al cabo un estudio de paternidad en tortugas loras, a través del análisis de tres microsatélites. Los autores encontraron evidencia de paternidad múltiple en 15 de 26 nidadas, y al igual que en el estudio de FitzSimmons (1998), la contribución de los múltiples machos no fue equitativa.

### **La tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829)**

La golfina, es la especie de tortuga marina más abundante en la actualidad. Su distribución es circuntropical. En el Pacífico Oriental se observa desde el noroeste de la Península de Baja California y el Golfo de California, hasta Chile, con áreas de concentración en el suroeste de Baja California, sur de Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, en México; y Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, en Centroamérica. México, junto con Costa Rica, tiene las poblaciones reproductoras más importantes del continente americano (Márquez, 1996).

La golfina es la más pequeña de las tortugas marinas actuales, los adultos tienen un caparazón de 60 a 70 centímetros de largo y su peso se encuentra alrededor de los 35 kilogramos. Los individuos adultos son verde olivo o grisáceo en el caparazón y crema amarillento en el plastron (Figura 1) (National Marine Fisheries Service y U.S. Fish and Wildlife Service [NMFS y USFWS], 1998).

Sus crías son negras, éstas y los juveniles poseen los márgenes anteriores del caparazón aserrados, los juveniles además poseen tres quillas dorsales longitudinales y dos ventrales. En la especie existe un ligero dimorfismo sexual, los machos maduros tienen colas substancialmente más largas y gruesas que las de las hembras (usadas para la cópula), y una de las uñas de las aletas delanteras es más larga y en forma de gancho (Figura 2). Las hembras tienen caparazones más altos y abombados y los machos poseen un plastron cóncavo, presumiblemente adaptado para el apareamiento (NMFS y USFWS, 1998).

Los apareamientos de estas tortugas se dan mayoritariamente en las zonas adyacentes a las playas de anidación, aunque se han encontrado parejas apareándose a mil kilómetros de la playa de anidación más cercana. Las tortugas golfinas anidan durante todo el año en la costa del Pacífico Oriental, con picos de septiembre a diciembre, la anidación es principalmente nocturna aunque se han reportado anidaciones diurnas. Las tortugas golfinas no son absolutamente fieles a su playa de anidación, ya que se han encontrado individuos anidando en playas separadas por varios kilómetros. Sus intervalos de anidación son de 28 días, con una

frecuencia de dos a cuatro anidaciones por temporada, en cada nidada depositan un promedio de 100 huevos (NMFS y USFWS, 1998).



Figura 1. Hembra adulta de tortuga golfina.



Figura 2. Pareja de tortugas golfinas apareándose. El macho utiliza las uñas alargadas de sus aletas delanteras para sostener el caparazón de la hembra durante el apareamiento

Esta especie de tortugas marinas es la más espectacular en sus hábitos reproductivos, ya que puede formar anidaciones masivas conocidas como arribazones<sup>4</sup>, que llegan a reunir más de cien mil individuos. Las playas de anidación más importantes en la actualidad son Escobilla y Morro Ayuta, en Oaxaca, Ostional y Nancite en Costa Rica, algunas playas de Guyana y Surinam, y Gahimarta, India (Márquez, 1996).

---

<sup>4</sup> El fenómeno de arribazón es exclusivo del género *Lepidochelys*, consiste en el ascenso sincrónico de varios miles de hembras que salen a desovar durante tres a cinco días, a lo largo de uno a cinco kilómetros de playa (Briseño-Dueñas, 1998).



Su alimentación es diurna y la realizan en aguas someras, se alimentan sobre todo de organismos bénticos, aunque durante sus migraciones se alimentan también de organismos pelágicos. En la zona entre Panamá y Colombia convergen para su alimentación, gran parte de las colonias anidadoras del Pacífico Oriental (Márquez, 1996).

Las tortugas golfinas, al igual que las otras especies de tortugas marinas, juegan un papel ecológico importante en el medio marino. En primera instancia forman parte de la cadena trófica como consumidores de peces, crustáceos, moluscos, erizos, salpas, medusas, briozoarios, algas, etc. (Bjorndal, 1997); asimismo, son presa de cangrejos, mamíferos terrestres, aves y peces carnívoros cuando son crías, y de diversos tipos de tiburones (Márquez, 1996) e incluso de orcas (Esquivel *et al.*, 1993) cuando son adultas. Por otro lado, Rosano-Hernández y Deloya (2002), enfatizan que la cantidad de materia orgánica depositada en las playas donde se dan las arribazones (de 20.6 a 137.6 toneladas de materia orgánica después de cada arribada durante la temporada de anidación 1992-1993 en Escobilla), sustenta una peculiar trama trófica de descomponedores y recicladores.

#### *Las tortugas golfinas de Escobilla*

A lo largo de toda la costa del Pacífico Mexicano se extienden playas de anidación de tortugas golfinas, en la mayoría de los sitios las hembras anidan de manera solitaria o en pequeñas agregaciones. Sólo en Escobilla y Morro Ayuta, en Oaxaca, prevalecen las arribazones. Mismaloya en Jalisco y Tlacoyunque en Guerrero, fueron playas de arribazón que se perdieron en la década de 1970 por sobreexplotación (Márquez *et al.*, 1990). Además de las citadas áreas en México, sólo existen zonas de arribazón en Costa Rica e India (Márquez, 1990), este hecho resalta la importancia a nivel nacional e internacional de las playas mexicanas para la reproducción de esta especie. En particular, la productividad de Escobilla es muy significativa para la población de tortugas golfinas del Pacífico Oriental (INE, 1999).

En 1967, la Secretaría de Pesca a través del Instituto Nacional de la Pesca, instaló un campamento tortuguero en esta localidad, y desde entonces ha dado seguimiento a la colonia

anidadora. Los datos recopilados desde la época de explotación hasta la fecha, muestran un incremento sostenido en el número de arribazones y anidaciones por temporada: tres arribazones y 230 mil nidos en 1973; 13 arribazones en 1994 y 958 mil nidos en 1999 (Márquez, Peñaflores y Vasconcelos, sin publicar en INE, 1999; Peñaflores *et al.*, 2000). Se estima que el número de anidaciones en la actual temporada de anidación (2003-2004) sobrepasó un millón (Cuauhtémoc Peñaflores, com. pers.).

Ante el panorama de aparente recuperación de la colonia anidadora de tortugas golfinas de Escobilla y la posible reapertura de su explotación, se hace evidente la necesidad urgente de realizar mayor investigación sobre ella, con la finalidad de sustentar posibles planes para su uso y manejo.

#### *Avances en el conocimiento de las tortugas golfinas mediante el uso de técnicas moleculares*

Hace apenas una década, prevalecían preguntas básicas sobre las relaciones interpopulacionales y la historia natural de las tortugas golfinas, que dificultaban el adecuado planteamiento de medidas para su conservación. El conocimiento estaba limitado a lo que los métodos convencionales habían podido aportar, tales como morfometría (Márquez *et al.*, 1976), marcaje-recaptura (Cornelius y Robinson, 1986 en NMFS y USFWS, 1998), y análisis estomacales (Montenegro-Silva *et al.*, 1986). Actualmente, la comprensión de la biología de esta especie ha sufrido una gran transformación, gracias a la introducción de los métodos moleculares en el estudio de sus poblaciones. Estos conocimientos constituyen valiosas armas para el diseño de planes para su manejo y conservación.

#### Sistemática

El nombre *Lepidochelys* deriva del griego *lepidos*, que significa escamas, y *chelys*, que significa tortuga. El género pertenece a la familia Cheloniidae y es el único del grupo de las tortugas marinas que contiene más de una especie (*L. olivacea* y *L. kempii*). Estas especies se caracterizan por su relativo tamaño pequeño, difieren entre sí en el número de escudos laterales del caparazón: *L. kempii* (tortuga lora) posee cinco pares, mientras que las tortugas

golfinas poseen de cinco a nueve pares, siendo más común que tengan de seis a ocho. De hecho, la tortuga golfinas es la única especie que posee un número variable, usualmente asimétrico, de escudos laterales (NMFS y USFWS, 1998).

La relación filogenética entre estas dos especies parece obvia hoy en día. Sin embargo, los primeros naturalistas que describieron a estos organismos los ubicaron en dos géneros diferentes (*Colpochelys* y *Lepidochelys*). Carr (1942 en Pritchard, 1997) propuso ubicar a ambas especies dentro del género *Caretta* o en un solo género diferente a *Caretta*, *Lepidochelys* Fitzinger. La segunda propuesta fue elegida por la mayoría de los autores subsecuentes. Años después hubo investigadores que insinuaron que *kempii* era una mera subespecie de *L. olivacea* (Pritchard, 1997).

Con el objetivo de clarificar el grado de divergencia evolutiva entre estas taxa, Bowen *et al.* (1991) realizaron un análisis de RFLPs del ADN mitocondrial, con el cual se demostró que las tortugas loras son filogenéticamente diferentes de las tortugas golfinas, y que constituyen taxa hermanos con respecto a otras especies de tortugas marinas.

### Filogeografía

Las tortugas loras tienen distribución geográfica restringida. Los adultos habitan solamente en el Golfo de México, se han registrado juveniles y preadultos en aguas costeras templadas del noroeste del Océano Atlántico. Hoy en día, su anidación se concentra en una localidad del estado de Tamaulipas (Márquez, 1996).

Las tortugas golfinas además de presentar arribazones en localidades de México, Costa Rica e India, anidan de manera no masiva en diferentes localidades del Indo Pacífico, ambos lados de África y la costa Atlántico de Sudamérica. La distribución de ambas especies está separada únicamente por el Mar Caribe (Bowen *et al.*, 1998).

Pritchard (1969 en Bowen *et al.*, 1998) trató de explicar esta distribución contigua proponiendo el siguiente modelo: las poblaciones ancestrales fueron separadas por la formación del Istmo de Panamá (hace 3.5 millones de años), dando lugar a dos clados, uno en

el Pacífico (tortuga golfinas) y otro en el Atlántico (tortuga lora). Las tortugas golfinas se dispersaron posteriormente hacia el Indo Pacífico y colonizaron el Atlántico recientemente.

Con el fin de evaluar este modelo biogeográfico, Bowen *et al.* (1998) realizaron comparaciones entre siete colonias anidadoras de tortugas golfinas, provenientes de toda su área de distribución, más la única colonia anidadora de tortugas loras, utilizando la secuencia de la región control del ADN mitocondrial. Los autores estimaron que la divergencia de estas especies data de hace 2.5 a 3.5 millones de años, lo cual es consistente con la propuesta de Pritchard. El haplotipo (tipo de secuencia) de tortugas golfinas más primitivo (aquel con mayor semejanza a los de tortugas loras) se halló en una colonia del Indo Pacífico, sugiriendo que la radiación más reciente de tortugas golfinas se dio en esta región y no en el Pacífico Oriental como se esperaba. Bajo este escenario, la radiación podría haber dado lugar a las poblaciones del Atlántico y del Pacífico Oriental (cuyos haplotipos difieren en uno y dos nucleótidos, respectivamente, de la secuencia más común del Indo Pacífico). Estas ligeras diferencias son consistentes con la reciente invasión al Atlántico postulada en el modelo de Pritchard; e implicaría que las colonias anidadoras del Pacífico Oriental habrían sido extirpadas, quizás por un descenso en la temperatura del agua, y recientemente recolonizadas a partir del Indo Pacífico hace aproximadamente 300 mil años. Este último descubrimiento remarca la naturaleza transitoria de las colonias anidadoras de tortugas marinas, particularmente en el Pacífico Oriental.

### Estructura poblacional

El trabajo de Bowen *et al.* (1998) muestra la separación de al menos dos linajes mitocondriales principales, adicionalmente encontraron diferencias significativas en las frecuencias de haplotipos entre localidades ampliamente separadas. Esta estructura poblacional a gran escala geográfica es congruente con la mostrada por *Caretta caretta* (tortuga caguama) y *Chelonia mydas* (tortuga verde). A menor escala geográfica, el panorama es diferente. Briseño-Dueñas (1998) estudió la variación genética de seis colonias anidadoras de tortugas golfinas del Pacífico Oriental, más una de Australia, utilizando el mismo marcador molecular que Bowen *et al.* Esta investigadora encontró que no existe estructura poblacional entre las colonias del Pacífico Oriental, mientras que sí hay una importante diferenciación entre éstas y la colonia de

Australia. Este resultado contrasta con la fuerte estructura poblacional entre colonias anidadoras regionales de otras especies de tortugas marinas como las tortugas verde, caguama y carey (Bowen y Karl, 1997).

Con base en su estudio molecular, Briseño-Dueñas (1998) estimó una tasa de migración de cuatro individuos por generación entre las colonias del Pacífico Oriental, y una tasa menor a 0.5 individuos por generación entre el Pacífico Oriental y la colonia de Australia. La tasa de migración estimada a partir de datos genéticos, es congruente con los datos obtenidos a partir de programas de marcaje-recaptura a largo plazo.

Por último, Briseño-Dueñas (1998) encontró entre las colonias del Pacífico Oriental, una diversidad nucleotídica homogénea y baja, con valores cercanos al límite inferior del intervalo mostrado por otras especies de tortugas marinas. Esta poca diversidad sugiere, en primer lugar, una colonización reciente hacia el este del Pacífico, tal como lo propusieron Bowen *et al.* (1998); y en segundo lugar, la posible existencia de estructura poblacional no detectable a través del análisis de secuencias del ADN mitocondrial. En este contexto, López-Chávez (2000) estudió la distribución de la variación genética entre siete colonias anidadoras del Pacífico Oriental utilizando microsatélites, con mayor nivel de variabilidad que el ADN mitocondrial, y que permiten detectar diferencias más sutiles entre poblaciones. Sus resultados reflejan, al igual que el trabajo de Briseño-Dueñas, panmixia entre las colonias de tortugas golfinas del Pacífico Oriental.

#### Antecedentes de estudio con microsatélites

Hoekert *et al.* (2002) utilizaron dos microsatélites para el estudio de los sistemas de apareamiento de las tortugas golfinas que anidan en la Reserva Natural de Galibi, Surinam. Con una probabilidad de detectar paternidad múltiple de 90.3%, los autores encontraron que dos de diez nidadas fueron fecundadas al menos por dos machos, el nivel de paternidad múltiple encontrado en este estudio fue menor al encontrado en tortugas loras (Kichler *et al.*, 1999). Los autores hacen hincapié en que la población de Surinam no representa una población de tortugas golfinas estable, ya que su tamaño continúa declinando rápidamente y no se han observado arribadas en los últimos 30 años. Por lo tanto, los niveles de paternidad

múltiple de esta población pueden diferir considerablemente de otras poblaciones más grandes. Los resultados contrastantes de Dutton *et al.* (2000) y Crim *et al.* (2002) en tortuga laúd, documentan la posibilidad de variación intraespecífica en la incidencia de paternidad múltiple en el grupo de las tortugas marinas

La variación genética detectada en microsatélites analizados en tortugas golfinas, se resume en la Tabla 1.

Entre los estudios en tortugas marinas con microsatélites en los que se reporta la conformidad de las frecuencias genotípicas con la ley de Hardy-Weinberg, únicamente Crim *et al.* (2002) reportaron que Cm84 tuvo un número deficiente de heterocigotos en la población de tortugas laúd analizada. Asimismo, López-Chávez (2000) detectó que Cm84 presenta desviaciones de los valores esperados según el equilibrio Hardy-Weinberg en las colonias anidadoras de tortugas golfinas de Platanitos, Nayarit y La Gloria, Jalisco. Este último autor lo atribuye a que el muestreo fue realizado en dos años distintos entre los cuales existe variación en las frecuencias alélicas, ya que al analizarlos por separado, se encuentran en equilibrio. No existe ningún reporte de ligamiento entre microsatélites en tortugas marinas.

En el presente trabajo se estudió la variabilidad de los microsatélites Cm72, Cm84, Ei8 y Cc117 en la colonia anidadora de tortugas golfinas de Escobilla, estos fueron elegidos a partir de resultados publicados (Tabla 1) con base en los criterios de mayor número de alelos y mayor valor de heterocigosidad. Adicionalmente, el Dr. Peter Dutton (Universidad de California en San Diego) proporcionó iniciadores para amplificar los microsatélites LB107, LB121, LB142 y LB143, identificados por él mismo en tortugas laúd (sin publicar).

Conocer la variabilidad genética de este conjunto de loci es un prerrequisito para realizar futuros estudios de paternidad en esta colonia anidadora, ya que la probabilidad de detectar múltiples padres fecundando una nidada depende, entre otras cosas, del número de loci analizados, la variabilidad de cada locus y las frecuencias de los alelos más comunes (FitzSimmons, 1996). Aunque exista un antecedente de estudio de paternidad en la especie (Hoekert *et al.*, 2002), éste corresponde a una población del Atlántico, que por lo tanto, es

genéticamente diferente a la del Pacífico Oriental (Bowen *et al.*, 1998); adicionalmente, esa población está sumamente mermada, al contrario de la población de Escobilla que muestra una tendencia hacia la recuperación (INE, 1999).

En la presente investigación se utilizan por primera vez los iniciadores LB107, LB121, LB142 y LB143 en el estudio de poblaciones de tortugas golfinas, constituyendo la primera evaluación de su utilidad para futuros estudios de la especie.

Es muy importante la incursión de la Universidad del Mar en la investigación de las tortugas marinas de la Costa de Oaxaca, en primera instancia por su ubicación geográfica, y en segunda, por el compromiso moral de la institución de colaborar con los esfuerzos realizados por otras instituciones de la zona como el Centro Mexicano de la Tortuga.

Tabla 1. Variabilidad genética de microsatélites en tortugas golfinas. Para cada referencia se presentan sucesivamente: número de alelos (valor sin paréntesis), tamaño de muestra (valor entre paréntesis), heterocigosidad observada (Ho) e intervalo de tamaños en pares de bases (pb).

<b>Locus</b> <b>(cita de la publicación de</b> <b>los iniciadores)</b>	<b>FitzSimmons <i>et al.</i>,</b> <b>1995</b>	<b>Kichler <i>et al.</i>,</b> <b>1999 y</b> <b>Kichler, 1999</b>	<b>Hoekert <i>et al.</i>,</b> <b>2002</b>	<b>López-Chávez,</b> <b>2000 (Escobilla)</b>
Cm3 (FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995)	1(10) Ho = 0.0 163 pb	_____	_____	_____
Cm58 (FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995)	1(9) Ho = 0.0 126 pb	_____	_____	_____
Cm72 (FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995)	2(10) Ho = 0.9 235-239 pb	3(22) Ho = 0.45	_____	3(20) Ho = 0.70 234-238 pb
Cm84 (FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995)	6(9) Ho = 0.44 328-338 pb	16(22) Ho = 0.9	_____	11(20) Ho = 0.75 320-346 pb
Cm84 (rediseñados por Kichler, sin publicar, citado en Hoekert <i>et al.</i> , 2002).	_____	_____	18(25) Ho = 0.8 186-197 pb	_____
Ei8 (FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995)	6(9) Ho = 0.44 186-226 pb	32(48) Ho=0.89	18(25) Ho=0.92 194-274 pb	_____
Cc141 (FitzSimmons, sin publicar, citado en Kichler <i>et al.</i> , 1999)	_____	2(48) Ho= 0.14	_____	2(10) Ho = 0.10 178-188 pb
KLk315 (Kichler <i>et al.</i> , 1999)	_____	2(28) Ho= 0.35	_____	_____
KLk316 (Kichler <i>et al.</i> , 1999)	_____	1(28) Ho = 0.0	_____	_____
Cc117 (FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995)	3(9) Ho = 0.11 216-234 pb	_____	_____	_____



## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar mediante PCR la variación de ocho microsatélites nucleares en la colonia reproductora de tortugas golfinas de Escobilla, Oaxaca.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. A partir de una serie de iniciadores diseñados para amplificar microsatélites de ADN nuclear de tortugas marinas, reconocer aquellos que generen productos de PCR.
2. Determinar el grado de polimorfismo de los loci amplificados.
3. Comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg.
4. Determinar si existe ligamiento entre los loci polimórficos.
5. Determinar cuáles microsatélites son útiles para estudios de paternidad.

## ÁREA DE ESTUDIO

El área de anidación conocida como Escobilla, es aledaña a la comunidad que lleva el mismo nombre (Figura 3), ubicada en el Municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca, a  $96^{\circ}44'$  Long. W y  $15^{\circ}47'$  Lat. N (Casas-Andreu, 1979). Abarca aproximadamente ocho kilómetros al extremo oeste de una playa de 22 kilómetros de extensión (Peñaflores *et al.*, 2000). En su porción arenosa, la playa tiene hasta 20 metros de ancho, se encuentra limitada hacia el continente por pequeños esteros de poca importancia que sólo drenan al mar durante la temporada de lluvias. A lo largo de la playa se encuentra un médano de poca altura, cubierto principalmente por *Ipomoea pes-caprae*. La franja arenosa de la playa está constituida principalmente por arena fina al tacto. El régimen de mareas para esta zona es de tipo semidiurno (Casas-Andreu, 1979). El clima de la región es cálido subhúmedo con lluvias en verano, correspondiente al tipo Aw (w) ig según Koppen, modificado por García (1973).

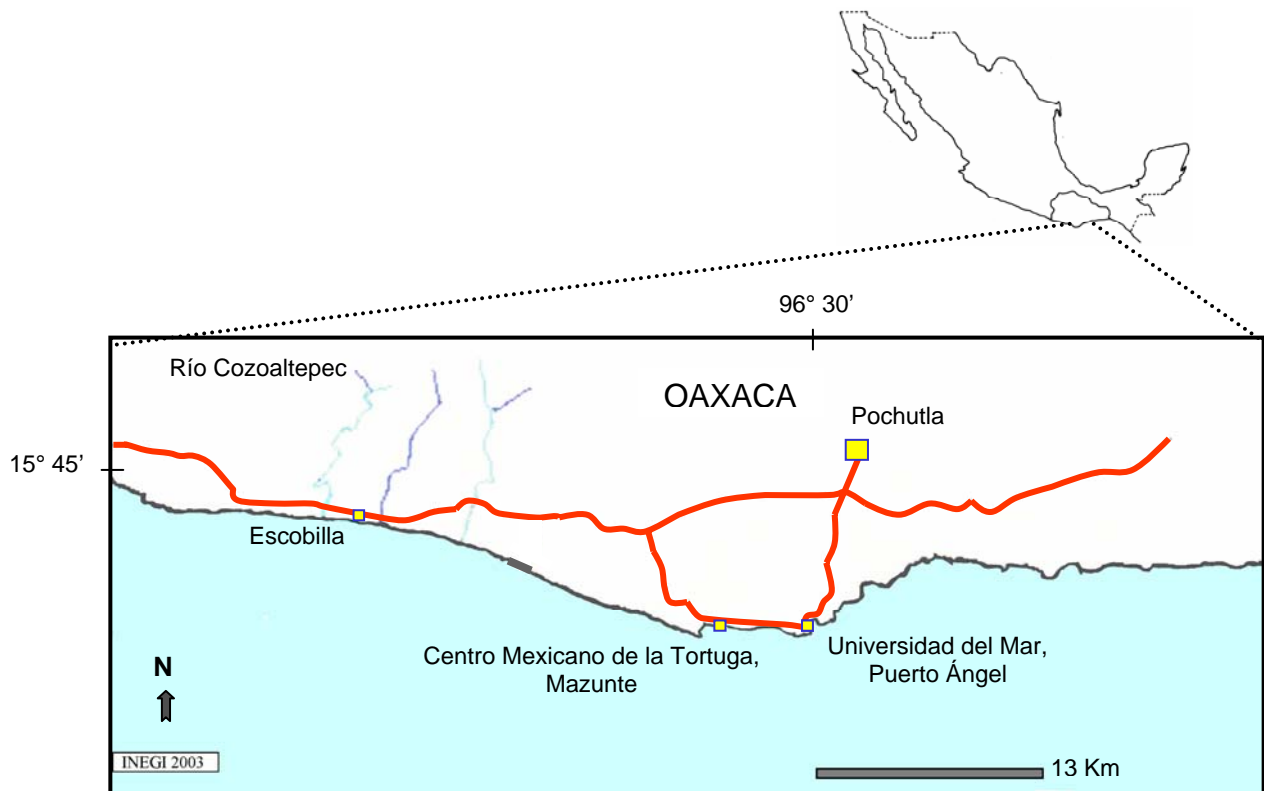


Figura 3. Ubicación geográfica de Escobilla, Oaxaca. En azul se muestran los ríos aledaños a la playa de anidación, en rojo se muestran los caminos pavimentados de dos carriles, y en amarillo, instituciones y localidades de referencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de muestras y extracción de ADN

Se obtuvieron muestras de sangre de tortugas golfinas durante la temporada de anidación 1999-2000. Las muestras provinieron de hembras que anidaron en Escobilla, o de individuos encontrados en el mar frente a la zona de anidación (50 hembras y 27 machos). Para evitar que una tortuga fuera muestreada dos veces, a cada individuo se le aplicó una marca metálica en la aleta anterior izquierda. Las muestras se colectaron y preservaron según Dutton (1996) (Anexo 1).

Algunas muestras se obtuvieron con el permiso de pesca de fomento No. 270300-213-03 emitido por la Dirección General de Administración de Pesquerías. El resto de ellas se obtuvo en trabajo conjunto con el personal del Centro Mexicano de la Tortuga (ubicado en Mazunte, Oaxaca y dependiente de la Dirección de Vida Silvestre de la SEMARNAT).

Se aisló el ADN total de las muestras realizando extracciones con fenol-cloroformo, siguiendo un protocolo modificado de Hillis *et al.* (1990) (Anexo 1).

### Análisis de microsatélites

#### a) Amplificación de microsatélites por PCR.

Para la amplificación por PCR se utilizaron volúmenes de reacción de 25  $\mu$ l, conteniendo  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, iniciadores 0.48 mM, aproximadamente 25 ng de ADN molde, y una unidad de polimerasa Taq (REDTaq de Sigma-Aldrich), en amortiguador para PCR 1X (el amortiguador contiene a concentración 10X: 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 a 25°C; 500 mM KCl; 0.01% gelatina). Se usaron los iniciadores diseñados por FitzSimmons *et al.* (1995) para Cm72, Cm84, Ei8 y Cc117 (cuyas secuencias se exponen en la Tabla 2), y los diseñados por Dutton (datos no publicados) para LB107, LB121, LB142 y LB143. Todos los iniciadores fueron diseñados para especies distintas a la tortuga golfinas. Típicamente, el perfil

de temperaturas usado para la amplificación consistió de un ciclo de cinco minutos a 95°C; 35 ciclos de un minuto a 95°C, un minuto a 54°C y dos minutos a 72°C; y un ciclo de cinco minutos a 72°C (Alberto Abreu, com. pers.).

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores para algunos de los microsatélites analizados.

<b>Locus</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
Cm72	CTATAAGGAGAAAGCGTTAAGACA CCAAATTAGGATTACACAGCCAAC
Cm84	TGTTTTGACATTAGTCCAGGATTG ATTGTTATAGCCTATTGTTTCAGGA
Ei8	ATATGATTAGGCAAGGCTCTCAAC AATCTTGAGATTGGCTTAGAAATC
Cc117	TCTTTAACGTATCTCCTGTAGCTC CAGTAGTGTCAGTTCATTGTTTCA

#### b) Detección de polimorfismos.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis de secuenciación en geles de poliacrilamida al 5%, y se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata (Creste *et al.*, 2001) (Anexo 1). Los resultados fueron almacenados en forma de imágenes (escáner y cámara digital) para su posterior análisis. El tamaño de las bandas alélicas se estimó mediante comparación con estándares comerciales (*50 bp ladder* de Sigma-Aldrich y *30-330 bp AFLPs*, de Invitrogen) (Anexo 1).

Característicamente, en los geles, las bandas de los microsatélites van acompañadas de bandas de tartamudeo, que son subproductos de la amplificación por PCR que difieren del alelo original en una unidad de repetición (Goldstein y Shlötterer, 1999). En la Figura 4 se muestra un ejemplo de la interpretación de las bandas resultantes de la amplificación de microsatélites.

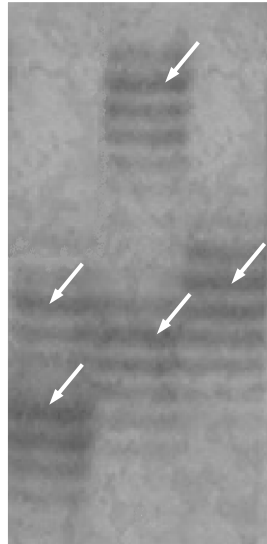


Figura 4. Interpretación de los productos de PCR de Cm84 de tres individuos. Las flechas señalan las bandas más intensas elegidas como alélicas, el resto de ellas fueron consideradas como bandas de tartamudeo.

La asignación de genotipos individuales fue apoyada mediante la inclusión de estándares internos en los geles. Se consideró como polimórfico a todo aquel locus en el que se hubieran detectado al menos dos alelos entre los individuos analizados.

#### Análisis estadístico

a) Frecuencias alélicas, equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento.

Se utilizó el programa Arlequin 2.00 (Schneider *et al.*, 2000) para el análisis de los loci que resultaron polimórficos (en el Anexo 2 se muestra un ejemplo del formato de ingreso de datos al programa). Las frecuencias de los alelos se estimaron mediante:

$$\hat{p}_i = \frac{x_i}{n}$$

y su desviación estándar ( $S$ ) mediante la raíz cuadrada de:

$$V(p_i) = \frac{\hat{p}_i(1 - \hat{p}_i)}{n - 1}$$

donde  $V$  es la varianza,  $\hat{p}_i$  es la frecuencia estimada del alelo  $i$ , y  $x_i$  son las veces que el alelo  $i$  es observado en una muestra que contiene  $n$  copias (Schneider *et al.*, 2000). Adicionalmente, se obtuvo el error estándar mediante:

$$E = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Para detectar desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg, se utilizó una prueba análoga a la prueba exacta de Fisher en una tabla de contingencia de dos por dos, pero extendida a una tabla de contingencia triangular de tamaño arbitrario. La prueba exacta de Fisher sirve para evaluar la independencia de dos variables, formando tablas de contingencia con totales marginales iguales. Evalúa la suma de probabilidades asociadas con la tabla observada y todas las tablas posibles que tengan marginales totales iguales. Si la suma es mayor al nivel de significancia (en este caso  $\alpha = 0.05$ ), entonces no se rechaza la hipótesis nula; en cambio, si la suma de probabilidades es menor al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula (Zar, 1996).

En lugar de enumerar todas las posibles tablas de contingencia, el programa usa una versión modificada de la cadena de Markov descrita por Guo y Thompson (1992 en Schneider *et al.*, 2000). Esta cadena consiste en un recorrido estocástico, en este caso de 100 mil pasos, en el espacio de todas las posibles tablas de contingencia. Se realiza de tal manera que la probabilidad de visitar una tabla particular corresponde a su probabilidad real bajo la hipótesis nula de independencia.

Con el objetivo de comenzar en una posición inicial aleatoria independiente a la tabla observada, la cadena se explora para un número de pasos de desmemorización predefinidos, en este caso 1000, los cuales deben ser los suficientes para permitir que la cadena de Markov sólo tome en cuenta el estado final. El programa estima el error estándar del valor  $P$  subdividiendo el número total de pasos requeridos en  $B$  lotes, calcula un valor  $P$  para cada lote por separado. El proceso termina cuando la desviación estándar estimada es menor que el valor predefinido por el usuario, en este caso, se utilizó el valor predeterminado por el programa (Schneider *et al.*, 2000).

Para la prueba de desequilibrio por ligamiento, se realizó una prueba exacta de Fisher entre todos los pares de loci polimórficos (Schneider *et al.*, 2000).

b) Utilidad de los microsatélites analizados en estudios de paternidad.

La utilidad de los microsatélites para estudios de paternidad se evaluó con base en dos probabilidades, cada una de ellas estimada para cada locus y para el conjunto de loci seleccionados.

La probabilidad de que dos individuos no relacionados compartan el mismo genotipo por locus (P), se estimó a través de:

$$P = \sum_{i=1}^n (2p_i^2)^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i>j}}^n (2p_i p_j)^2$$

donde  $p$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo, de  $n$  alelos. Así mismo, se estimó la probabilidad de que dos individuos no relacionados compartan el mismo genotipo en varios loci (Q), multiplicando las probabilidades calculadas para cada locus mediante:

$$Q = \prod_{k=1}^m \left[ \sum_{i=1}^n (2p_{ik}^2)^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i>j}}^n (2p_{ik} p_{jk})^2 \right]$$

donde  $k$  es el número de locus, de  $m$  loci (Hanotte *et al.*, 1991 en FitzSimmons, 1996). La probabilidad de detectar paternidad múltiple a través de un solo locus ( $d$ ), se calculó mediante:

$$d = 1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2 a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$$

donde  $a_x = \sum_{i=1}^n p_i^x$  y  $p_i$  es la frecuencia de el  $i$ -ésimo alelo, para un total de  $n$  alelos (Westneat *et al.*, 1987 en FitzSimmons, 1998). La probabilidad de detectar paternidad múltiple a través de todos los loci (D) se obtuvo a partir de:

$$D = 1 - \prod_{i=1}^m (1 - d_i)$$

donde  $m$  es el número de loci. Este valor depende de las frecuencias alélicas en la población reproductora y toma en cuenta todas las combinaciones genotípicas que no permitirían la detección de paternidad múltiple (por ejemplo, dos machos compartiendo el mismo genotipo o dos machos homocigotos para diferentes alelos) (Westneat *et al.*, 1987 en FitzSimmons, 1998).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Loci amplificados

Los ocho pares de iniciadores probados dieron productos de amplificación del tamaño esperado, excepto los iniciadores para Cc117, cuyos productos de amplificación consistieron de varias bandas aparentemente monomórficas, de tipo microsatelital (por la presencia de bandas de tartamudeo características) y de tamaños similares a los descritos por FitzSimmons *et al.* (1995) (Figura 5). Ante esta diversidad de bandeo en los productos amplificados, no fue posible definir qué conjunto de bandas corresponde al locus microsatelital descrito por los autores anteriormente citados, impidiendo la determinación de la variación de este locus en los individuos analizados.

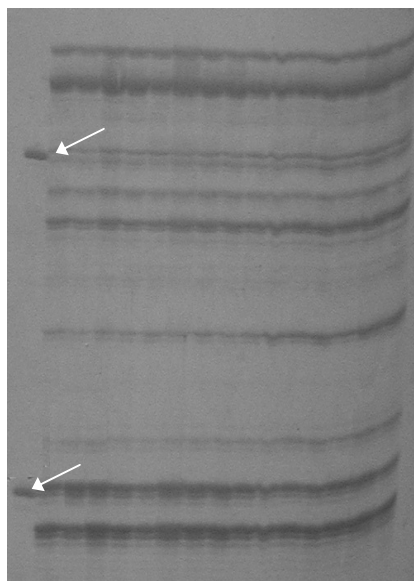


Figura 5. Productos de amplificación de Cc117. Las flechas indican las bandas del marcador de peso molecular correspondientes a los 250 y 200 pb.

Los iniciadores utilizados en el presente trabajo son heterólogos, es decir, fueron desarrollados a partir de otras especies de tortugas marinas, en el caso específico de Cc117, a partir de tortugas caguamas. FitzSimmons *et al.* (1995) encontraron en una muestra de nueve tortugas golfinas, tres alelos con tamaños de 216 a 234 pb. En la presente investigación, estos resultados no pudieron ser reproducidos, incluso utilizando el perfil de temperaturas para la PCR descrito por ellos. Los productos mostrados en la Figura 5 fueron obtenidos tras aplicar una variación del perfil de temperaturas especificado en el método.

Para poder hacer uso de Cc117 en estudios poblacionales de tortugas golfinas, será necesario optimizar las condiciones de amplificación en cada laboratorio, ya que aparentemente los resultados reportados para Cc117 en tortugas golfinas por FitzSimmons *et al.* (1995), no son reproducibles.

### Polimorfismo

Entre los siete loci cuya variación pudo ser estudiada, se encontraron cinco polimórficos con entre tres y 29 alelos. Se hallaron, con igual frecuencia, diferencias alélicas pares e impares. En la Figura 6 se muestra la variación de LB121, en el que todos los individuos son homocigotos para un único alelo de 142 pb. En la Figura 7 se muestra la variación detectada en Cm84, en ella se observa que la mayoría de los alelos difieren entre sí por una sola base. Hoekert *et al.* (2002) encontraron también diferencias alélicas de una base en la región amplificada con los iniciadores de Cm84 rediseñados por Kichler (sin publicar), en tortugas golfinas de Surinam.

Las mutaciones predominantes en los microsatélites son las que involucran cambios en el número de repeticiones de la unidad básica (Li *et al.*, 2002). Como la unidad de repetición de los microsatélites aquí estudiados es de dos bases, se esperaría que las diferencias entre alelos fueran únicamente de múltiplos de dos bases. Las diferencias impares encontradas no pueden explicarse exclusivamente por los dos mecanismos mutacionales propuestos para la evolución de microsatélites (ver la sección *¿Qué son los microsatélites?* en la introducción), ya que a través de ambos mecanismos se ganan o se pierden unidades de repetición. La explicación de este fenómeno se halla en las mutaciones de tipo puntual (sustituciones, deleciones e inserciones) que, según Levinson y Gutman (1987), pueden crear nuevas unidades repetitivas, que a su vez logran propagarse por eventos adicionales de deslizamiento entre las cadenas de ADN, lo que posiblemente de lugar a repeticiones en tándem de unidades cercanamente relacionadas.

Es importante hacer notar que los tamaños de los alelos fueron estimados por comparación con estándares comerciales. Para determinar con mayor precisión las diferencias alélicas impares, será necesario obtener las secuencias de los alelos.

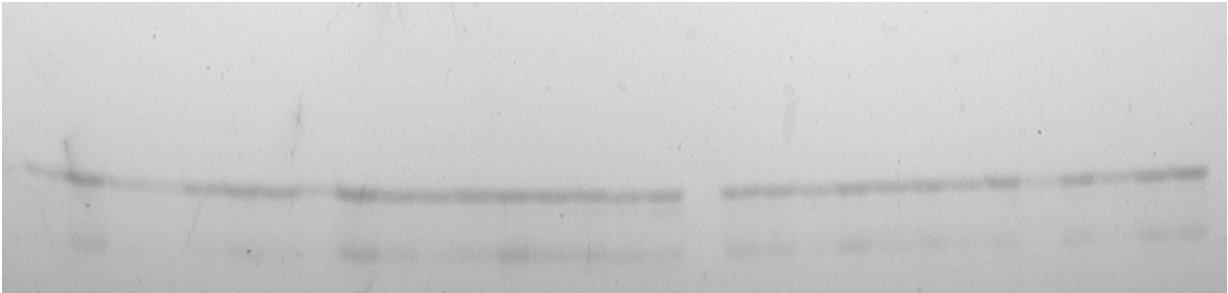


Figura 6. Ejemplo de un locus monomórfico. En esta imagen se muestra que en LB121, todos los individuos analizados fueron homocigotos para un solo alelo.

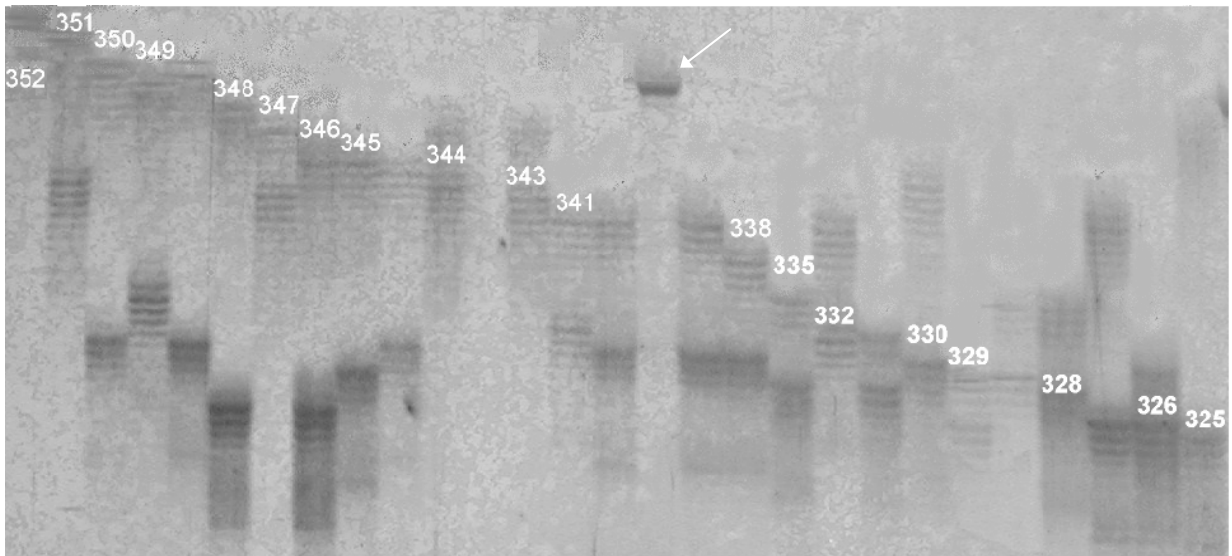


Figura 7. Gran variabilidad detectada en Cm84. Los valores en la parte superior de algunos alelos representan su tamaño en pares de bases, la flecha señala la banda correspondiente a 350 pb del marcador de peso molecular.

En la Tabla 3 se resumen los resultados de la variación genética detectada (número de alelos y heterocigosidad). Los valores de heterocigosidad observada corresponden a los derivados de la prueba de conformidad con el equilibrio Hardy-Weinberg.

Tabla 3. Variación detectada en los loci analizados.

<b>Locus</b>	<b>No. de alelos</b>	<b>Tamaño de los alelos (pb)</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>n</b>
Cc117	Aparentemente 1	190 a 270	N.D.	25
LB121	1	142	0.00	30
LB142	1	215	0.00	27
LB107	3	149, 150, 151	N.D.	29
LB143	3	191, 192, 194	0.07	28
Cm72	4	233, 235, 237, 239	0.49	77
Cm84	20	325, 326, 328, 329, 330, 332, 335, 338, 340, 341, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352	0.92	75
Ei8	29	185, 187, 189, 193, 196, 198, 199, 203, 210, 213, 215, 218, 220, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 238, 240, 242, 244, 246, 253, 258, 263, 273	0.96	62

H<sub>o</sub>, heterocigosidad observada; n, tamaño de muestra; N.D., no determinada.

LB121 y LB142 resultaron monomórficos, LB107 presentó tres alelos, pero su utilidad para distinguir genotipos individuales se vio imposibilitada por varios factores: 1) la diferencia de tamaño entre ellos fue de solamente una base; 2) la presencia de bandas de tartamudeo; 3) una intensidad generalmente débil de los fragmentos amplificados.

LB143 también presentó tres alelos, dos de ellos poco representados en la población, dando lugar a una heterocigosidad muy baja.

Cm72 reveló cuatro alelos, lo cual representa el mayor número reportado hasta ahora para la tortuga golfina. Para este mismo locus, FitzSimmons *et al.* (1995) reportaron dos alelos en una sola colonia anidadora (n=10) (ver Tabla 1, p.20), mientras que López-Chávez (2000) reportó tres alelos en ocho colonias anidadoras, una de las cuales (n=20) fue la misma que se

analizó en nuestro trabajo. Los tamaños reportados para esos alelos son prácticamente idénticos a los descritos en nuestro estudio, en el que se observó que los de tamaño extremo (233 pb y 239 pb) aparecieron en frecuencias muy bajas (0.026 y 0.032, respectivamente). Estas bajas frecuencias, aunadas al pequeño tamaño de muestra de los estudios citados, explicarían los resultados obtenidos. La heterocigosidad observada para este locus (0.49) fue menor a la reportada por López-Chávez (2000) para la colonia anidadora de Escobilla (0.70), aunque muy semejante a la heterocigosidad promedio de las ocho colonias estudiadas por este autor (0.47). Es muy posible, que el alto valor de heterocigosidad citado para Escobilla se deba al reducido tamaño de muestra, en comparación con el del presente estudio y con el conjunto de individuos analizados para ocho colonias ( $n=77$  y  $n=177$  respectivamente).

En el caso de Cm84, su variación fue caracterizada por los mismos autores y en los mismos individuos referidos en el párrafo anterior. FitzSimmons *et al.* (1995) encontraron seis alelos, mientras que López-Chávez (2000) encontró 11. En el presente trabajo se encontraron 20 alelos, los cuales tuvieron frecuencias similares entre ellos, confiriendo a este locus uno de los mayores valores de heterocigosidad observada para este locus en la especie: 0.92 (el presente trabajo) vs. 0.90 (Kichler, 1999) y 0.75 (López-Chávez, 2000).

En cuanto a Ei8, estudios realizados en tortuga golfina por FitzSimmons *et al.* (1995) ( $n=9$ ), Kichler *et al.* (1999) ( $n=48$ ), y Hoekert *et al.* (2002) ( $n=25$ ) reportaron 6, 32 y 18 alelos, respectivamente. Nuestros resultados corroboraron la alta variabilidad descrita hasta ahora para este locus, habiéndose detectado 29 alelos y una heterocigosidad observada de 0.96. Por lo anterior, Ei8 posee el mayor nivel de polimorfismo y heterocigosidad encontrado en la presente investigación.

Tanto en el caso de Cm84 como en el de Ei8, los niveles de variabilidad genética superiores a los reportados en la literatura para la especie, se atribuyen a las diferencias de los tamaños de muestra. Por otra parte, estas diferencias resaltan la importancia del tamaño de muestra en este tipo de estudios.

### Frecuencias alélicas

Las frecuencias de los alelos de los cuatro loci que mostraron polimorfismos útiles, se presentan en la Tabla 4, y su distribución se compara en la Figura 8. En ellas se observa que en LB143 los alelos no se distribuyeron equitativamente, pues el de tamaño intermedio (192 pb) tuvo una frecuencia cercana al 90%.

De manera similar, en Cm72 los dos alelos de tamaño intermedio fueron comunes mientras que los de tamaño extremo fueron raros. En conjunto, la frecuencia de los alelos comunes fue un poco mayor al 90%. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Kichler (1999), quien en una muestra de tortugas golfinas, encontró un alelo con frecuencia muy baja (2%) y dos con frecuencia muy alta (98%). López-Chávez (2000) encontró que en Escobilla el alelo más común es el de 234 pb, seguido por el de 236 pb.

Los tamaños estimados por este autor para los alelos de Cm72 fueron de 234, 236 y 238 pb, mientras que nuestros tamaños estimados fueron de 233, 235, 237 y 239 pb. Esto sugiere por un lado, que los alelos de 234 y 236 pb de López-Chávez son los mismos alelos de 235 y 237 pb respectivamente, de la presente investigación, y por otro, que este autor no pudo detectar el alelo de 233 pb tal vez debido a su baja frecuencia en la población y al pequeño tamaño de la muestra analizada.

En Cm84, los cuatro alelos más frecuentes (de 330, 328, 329 y 332 pb) representan poco más del 40% de la variación, en el otro extremo, están presentes dos alelos raros (de 349 y 351 pb) con una representación de 1.4%. López-Chávez (2000) reportó para este locus en la colonia anidadora de Escobilla, cinco alelos comunes que juntos abarcan el 76% de la variación. Es difícil determinar si los alelos comunes descritos por este autor son los mismos detectados en esta investigación, ya que, aunque el intervalo de tamaños entre ambos trabajos es muy similar, el tamaño de la mayoría de los alelos no coincide. Kichler (1999) reportó dos alelos comunes (cerca del 30%), cuatro alelos poco comunes (31%) y diez alelos raros (38%).

Tabla 4. Frecuencias alélicas en LB143, Cm72, Cm84 y Ei8. Los datos sombreados corresponden a los alelos más frecuentes.

Tamaño del alelo (pb)	Frecuencia	Error estándar	Tamaño del alelo (pb)	Frecuencia	Error estándar
<b>LB143 ( n= 56)</b>			<b>Cm72 (n = 154)</b>		
191	0.071	0.005	233	0.026	0.001
192	0.892	0.005	235	0.662	0.003
194	0.035	0.003	237	0.279	0.003
<b>Ei8 (n = 124)</b>			<b>Cm84 (n = 150)</b>		
185	0.032	0.001	325	0.053	0.001
187	0.169	0.003	326	0.047	0.001
189	0.016	0.001	328	0.100	0.002
193	0.008	0.0007	329	0.080	0.002
196	0.073	0.002	330	0.200	0.003
198	0.040	0.002	332	0.080	0.002
199	0.040	0.002	335	0.040	0.001
203	0.040	0.002	338	0.047	0.001
210	0.024	0.001	340	0.040	0.001
213	0.008	0.002	341	0.047	0.001
215	0.040	0.002	343	0.067	0.002
218	0.040	0.002	344	0.020	0.0009
220	0.032	0.001	345	0.020	0.0009
223	0.048	0.001	346	0.040	0.001
225	0.024	0.001	347	0.027	0.001
227	0.073	0.002	348	0.047	0.001
229	0.032	0.001	349	0.007	0.0006
231	0.024	0.001	350	0.013	0.0007
233	0.008	0.0007	351	0.007	0.0006
235	0.016	0.001	352	0.020	0.0009
238	0.024	0.001			
240	0.065	0.002			
242	0.024	0.001			
244	0.016	0.001			
246	0.032	0.001			
253	0.008	0.0007			
258	0.008	0.0007			
263	0.016	0.001			
273	0.016	0.001			

n, número de alelos en la muestra.

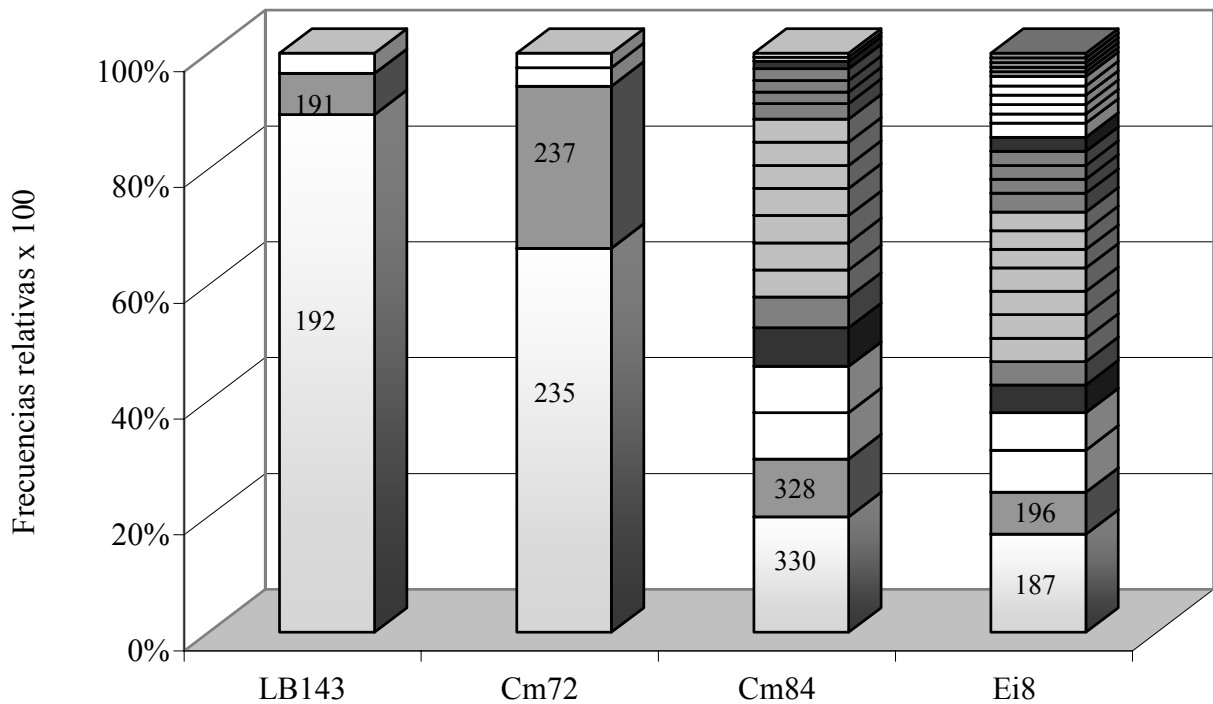


Figura 8. Distribución alélica de los cuatro loci en la población. En cada barra se identifican con su tamaño en pb, los dos alelos más comunes de cada locus.

Las frecuencias alélicas están distribuidas más homogéneamente en Ei8, el alelo más común (de 187 pb) ocupa únicamente el 16.9% de la variación, le siguen tres alelos comunes (de 196, 227 y 240 pb) que juntos ocupan el 21%, mientras que los cinco alelos más raros alcanzan en conjunto sólo el 4%. Kichler (1999) indica la presencia de un alelo común en este locus (12.5%), siete poco comunes (39%) y 24 raros (47%). Hoekert *et al.* (2002) encontraron que el alelo más común es el de 198 pb, con poco más del 20% de representación en la población, le siguen los alelos de 206 y 208 pb con casi el 30% y varios alelos raros con frecuencias menores al 5%. Las diferencias en las frecuencias alélicas entre este trabajo y el de Hoekert *et al.*, posiblemente sean un reflejo de la divergencia evolutiva de las tortugas golfinas del Pacífico Oriental Tropical y las del Atlántico.



## Equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la prueba exacta de Fisher para el análisis de conformidad con el equilibrio Hardy-Weinberg. En ella se observa que Cm72, Cm84 y Ei8 se encuentran en equilibrio en la población, mientras que LB143 se aparta significativamente de lo esperado.

Tabla 5. Resultados de la prueba de conformidad con el equilibrio Hardy-Weinberg.

<b>Locus</b>	<b>n</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>P</b>	<b>d.s.</b>
LB143	28	0.07	0.20	0.001*	0.00008
Cm72	77	0.49	0.49	1.000	0.00000
Cm84	75	0.92	0.92	0.142	0.00070
Ei8	62	0.96	0.94	0.308	0.00042

n, tamaño de muestra; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; P, nivel de probabilidad; d.s., desviación estándar. Se marca con asterisco el caso donde se encontraron diferencias significativas.

LB143 mostró una deficiencia significativa de heterocigotos respecto al valor esperado. Esto probablemente se deba a la presencia de mutaciones en las secuencias que flanquean al microsatélite, las cuales impiden el pegado de los iniciadores durante la PCR, dando lugar a alelos que no se amplifican, llamados alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995). Si este fuera el caso, y si en la muestra poblacional estuvieran efectivamente representados todos los posibles genotipos, se esperaría la presencia de homocigotos para alelos nulos, es decir, individuos que de manera consistente, no tuvieran producto de amplificación. Sin embargo, todos los individuos analizados (30) tuvieron producto de amplificación, aunque dos de ellos de mala calidad cuyos genotipos fueron dudosos y por ello fueron excluidos del análisis. Otra causa puede ser la acción de alguna fuerza evolutiva como la selección natural actuando sobre este locus.

Al igual que muestran los resultados de este trabajo, López-Chávez (2000) y Kichler (1999), reportaron frecuencias en el equilibrio para Cm72 y Cm84, así como esta última autora y Hoekert *et al.* (2002) para Ei8.

Cabe mencionar que en el caso de Ei8, en un análisis inicial con 70 individuos, se detectó una deficiencia de heterocigotos (o un exceso de homocigotos). Lo anterior se puede deber, como en LB143, a la presencia de alelos nulos o a la acción de la selección natural. Sin embargo, también es factible una causa metodológica: se observó que la PCR favorece la amplificación de los alelos de menor longitud sobre la de los alelos más grandes, resultando en dificultades para la detección de los alelos largos (Figura 9). Este es un artefacto común de la técnica y ha sido documentado por otros autores (FitzSimmons *et al.*, 1995). Es posible que en algunos individuos heterocigotos con alelos de tamaños muy diferentes y con poco producto de amplificación, el alelo largo no haya sido detectado por la tinción con nitrato de plata. De hecho, entre los nueve individuos homocigotos detectados en la población, sólo uno lo fue para un alelo grande (de 242 pb), los ocho restantes fueron homocigotos para los alelos de 185, 187, 196, 198, 199 y 220 pb.



Figura 9. Productos de amplificación de Ei8 en dos individuos heterocigotos. En el carril de la izquierda, la diferencia entre los alelos (señalados con flechas) es de apenas seis bases y la intensidad entre ellos es equivalente, mientras que en el carril de la derecha, la diferencia es de 20 bases y el alelo de mayor longitud es apenas perceptible.

Por lo tanto, debido a que es probable que la asignación de genotipos para estos individuos en particular, haya sido errónea, las estimaciones y pruebas estadísticas aplicadas a Ei8 en el presente trabajo, no consideran a los homocigotos para alelos cortos.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la prueba de desequilibrio por ligamiento. Todos los valores de  $P$  fueron mayores de 0.05, por lo tanto, puede considerarse que no existe ligamiento entre LB143, Cm72, Cm84 y Ei8. Entre los pares de loci analizados, se encontró información en la literatura únicamente para el par Cm84 y Ei8 (Kichler *et al.*, 1999). En dicho trabajo, realizado con tortuga lora, no se encontró ligamiento entre estos loci.

Tabla 6. Resultados de la prueba de desequilibrio por ligamiento.

<b>Pares de loci</b>	<b><math>P</math></b>	<b>d.s.</b>	<b>n</b>
LB143 y Cm72	0.097	0.00094	28
LB143 y Cm84	0.590	0.0013	28
LB143 y Ei8	0.327	0.0008	20
Cm72 y Cm84	0.051	0.00037	75
Cm72 y Ei8	0.284	0.0010	61
Cm84 y Ei8	0.295	0.0002	60

$P$ , nivel de probabilidad; d.s., desviación estándar; n, tamaño de muestra (número de individuos).

En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos en las diferentes fases del análisis, en cada una de ellas, se fueron descartando loci: Cc117 por la amplificación de varias regiones microsatelitales de manera simultánea, LB121 y LB142 por ser monomórficos, LB107 por la imposibilidad de asignar genotipos, y LB143 por no estar en equilibrio Hardy-Weinberg. De tal manera que se evaluó la utilidad para estudios de paternidad, únicamente de Cm72, Cm84 y Ei8.

Tabla 7. Resumen de resultados en las diferentes fases del análisis.

<b>Fases del análisis / Locus</b>	<b>LB107</b>	<b>LB121</b>	<b>LB142</b>	<b>LB143</b>	<b>Cc117</b>	<b>Cm72</b>	<b>Cm84</b>	<b>Ei8</b>
1) Productos de amplificación del tamaño esperado.	+	+	+	+	-	+	+	+
2) Polimorfismo (al menos dos alelos).	+	-	-	+		+	+	+
3) Asignación de genotipos en la muestra.	-			+		+	+	+
4) Conformidad con el equilibrio Hardy-Weinberg.				-		+	+	+
5) Ausencia de desequilibrio por ligamiento.						+	+	+

+, seleccionado; -, rechazado.

#### Utilidad de los microsatélites analizados para estudios de paternidad

En la Tabla 8, se muestran los resultados de las probabilidades estimadas con el objeto de evaluar la utilidad de Cm72, Cm84 y Ei8 para estudios de paternidad. En ella se observa que la probabilidad de que dos individuos no emparentados compartan el mismo genotipo por locus (P) varió de 0.006 en Ei8, hasta 0.2 en Cm72, lo cual es un reflejo del nivel de variabilidad genética de ambos loci (muy alto en el primero y limitado en el segundo). La probabilidad de que dos individuos no emparentados compartan el mismo genotipo a través del conjunto de loci bajo análisis (Q) es extremadamente pequeña, tanto si se considera Cm72 ( $2.4 \times 10^{-5}$ ) como si no se considera ( $12 \times 10^{-5}$ ). De tal manera que en un estudio de paternidad, se puede determinar con una alta confiabilidad la singularidad de los genotipos paternos por medio del análisis exclusivo de Cm84 y Ei8.

La probabilidad de detectar paternidad múltiple por locus (d) fue muy pequeña para Cm72 con respecto a Cm84 y Ei8. La probabilidad de detectar genes de diferentes padres entre la

descendencia a través de estos loci (D), fue muy alta cuando se consideró a Cm72 (0.9816), pero también cuando no se le consideró (0.9762). En diferentes estudios de tortugas marinas en los que se han detectado múltiples padres, los valores de D han ido desde 0.85 con tres loci en tortugas laúd (Crim *et al.*, 2002), 0.9 con dos loci en tortugas golfinas del Atlántico (Hoekert *et al.*, 2002), hasta 0.99 con cinco loci en tortugas verdes (FitsSimmons, 1998).

El conjunto de resultados obtenidos en esta investigación, señala que Cm72 es poco informativo para estudios de paternidad, y por lo tanto, únicamente Cm84 y Ei8 serán útiles para efectuar este tipo de investigaciones en la colonia anidadora de tortugas golfinas de Escobilla.

Por otro lado, a pesar de que LB107, LB121, LB142 y LB143 no resultaron útiles para estos fines, el presente trabajo constituye el primer reporte de su variación en la especie.

Tabla 8. Probabilidad de detectar paternidad múltiple con Cm72, Cm84 y Ei8.

<b>Locus</b>	<b>P</b>	<b>d</b>
Cm72	0.20	0.23
Cm84	0.02	0.83
Ei8	0.006	0.86
<b>Tomando los tres loci</b>	<b>Q = <math>2.4 \times 10^{-5}</math></b>	<b>D = 0.9816</b>
<b>Tomando sólo Cm84 y Ei8</b>	<b>Q = <math>12 \times 10^{-5}</math></b>	<b>D = 0.9762</b>

P, probabilidad de que dos individuos no emparentados compartan el mismo genotipo por locus; Q, probabilidad de que dos individuos no emparentados compartan el mismo genotipo en los tres loci; d, probabilidad de detectar paternidad múltiple por locus; D, probabilidad de detectar genes de diferentes padres entre la descendencia a través de los tres loci.

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado en siete (LB107, LB121, LB142, LB143, Cm72, Cm84 y Ei8) de los ocho microsatélites probados.
2. Los resultados de amplificación de Cc117 reportados para la especie por FitzSimmons *et al.* (1995), no fueron reproducidos en esta investigación.
3. LB121 y LB142 resultaron monomórficos para una única variante de 142 y 215 pb, respectivamente; mientras que LB107, LB143, Cm72, Cm84 y Ei8 resultaron polimórficos para un intervalo de tres a 29 alelos.
4. A pesar de que las unidades básicas de repetición de los microsatélites estudiados son de dos bases, se encontraron diferencias alélicas impares en la misma cantidad que las pares.
5. En Cm72, Cm84 y Ei8, se encontraron niveles de variación genética (expresados en el número de alelos y el valor de heterocigosidad) superiores a los reportados en la literatura, lo cual se atribuye al tamaño de muestra empleado en el presente estudio.
6. LB143 no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en la población ( $P < 0.05$ ), mientras que Cm72, Cm84 y Ei8, sí lo están ( $P > 0.05$ ).
7. LB143, Cm72, Cm84 y Ei8 no se encuentran ligados entre sí ( $P > 0.05$ ).
8. La probabilidad estimada de que dos individuos elegidos al azar de la población compartan el mismo genotipo en Cm72, Cm84 y Ei8 fue de  $2.4 \times 10^{-5}$ ; mientras que para Cm84 y Ei8 fue de  $12 \times 10^{-5}$ .
9. La probabilidad de detectar paternidad múltiple a través de la combinación, tanto de Cm72, Cm84 y Ei8, como de exclusivamente Cm84 y Ei8, fue de 0.98.

10. De los ocho loci estudiados, únicamente Cm84 y Ei8 resultaron útiles para realizar estudios de paternidad en la colonia anidadora de tortugas golfinas de Escobilla, Oaxaca.

## PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados derivados del presente trabajo de tesis, constituyen herramientas útiles para el estudio de algunos aspectos de la biología de las tortugas golfinas, incluyendo cuestiones directamente relacionadas con su conservación.

En primera instancia, sirven de base indispensable para investigar la incidencia de paternidad múltiple en la especie, estudios que son importantes por las implicaciones evolutivas que tienen los apareamientos múltiples como estrategia reproductiva. En la medida en que aumenta la proporción de paternidad múltiple, se incrementa la variación genética en la descendencia y el tamaño efectivo de la población (Sugg y Chesser, 1994 en Davis *et al.*, 2001).

Adicionalmente, se puede obtener evidencia indirecta de almacenamiento espermático. Esta característica se ha propuesto para varias especies de tortugas marinas en las que se han realizado estudios de paternidad, incluyendo *L. kempii* (Kichler *et al.*, 1999). Ya que se encontró que nidadas consecutivas de varias hembras bajo estudio, en una temporada de anidación, fueron fecundadas por los mismos padres, sugiriendo que los apareamientos ocurren en períodos específicos al principio de la temporada de reproducción. De la misma manera, se esperaría que este fuera el caso para las tortugas golfinas, ya que el estudio de sus ciclos hormonales ha revelado un periodo discreto de receptividad al apareamiento (Owens, 1997).

Debido a que no todas las hembras de la especie se reproducen anualmente, sino que algunas lo hacen bianualmente (Márquez, 1996), será posible determinar si existen diferencias en la composición genética de los reproductores entre temporadas, tomando como referencia la muestra poblacional obtenida para esta investigación (temporada de anidación 1999-2000).

Por otro lado, se ha sugerido la extracción de los huevos depositados al comienzo de la temporada de anidación en Escobilla, para fines de consumo humano. Esta sugerencia ha sido apoyada por el hecho de que un alto porcentaje de los nidos de las primeras arribazones, son



destruidos por las hembras de las arribazones posteriores (Peñaflares *et al.*, 2000). La cosecha controlada de huevos ya se realiza en Ostional, Costa Rica (otra playa donde ocurren arribazones en dimensiones similares a Escobilla), desde hace 16 años y sin aparente deterioro de la población (Ballesterro *et al.*, 2000).

A cualquier iniciativa de explotación, es necesario darle sustento. Las herramientas obtenidas se pueden aplicar para responder la pregunta de si el acervo genético entre progenies de arribazones de una temporada, en una colonia anidadora, es similar. Si se llegara a comprobar la hipótesis de la similitud, desde el punto de vista genético no habría argumentos en contra de la remoción de huevos, ya que se podrían extraer los nidos de algunas arribazones sin erosionar el acervo genético de la colonia. Es importante señalar, que para sustentar cualquier decisión de explotación de este tipo, será indispensable realizar paralelamente estudios desde otras perspectivas, como la ecología cuantitativa, la sociología de las comunidades y la manera en que esta nueva alternativa podría beneficiarlos económicamente sin deteriorar la condición de la población de tortugas.

Para propósitos de comparación de los resultados de esta tesis con los de otros grupos de trabajo, será necesario verificar los tamaños precisos de los alelomorfos contra marcadores universales de tamaño, con el fin de homologar las nomenclaturas (basados en los tamaños en pares de base de las bandas) asignadas por distintos autores.

Para trabajos subsecuentes con microsatélites, en cualquier contexto, se recomienda hacer uso de  $Ei8$  con precaución, debido a las dificultades encontradas en el reconocimiento de heterocigotos con alelos de tamaños contrastantes.

Como alternativa para evitar el problema de la amplificación preferencial de alelos cortos, se podrían probar otros protocolos de PCR que incluyeran, en una misma reacción, temperaturas que favorezcan la amplificación de fragmentos grandes y temperaturas que favorezcan la amplificación de alelos pequeños. Una estrategia adicional para elucidar el genotipo de individuos que se sospechen ser heterocigotos cuyo alelo largo no puede definirse, sería por

medio de la tipificación de genotipos de progenies para deducir el genotipo de la madre en duda.

Finalmente, ante el estatus problemático de Ei8, actualmente existe una alternativa. En fechas posteriores al desarrollo de la presente investigación, se publicaron las secuencias de iniciadores para la amplificación de seis nuevos microsatélites, las cuales fueron derivadas de *Lepidochelys olivacea*. Cinco de estos microsatélites resultaron ser altamente polimórficos y con elevados valores de heterocigosidad cuando fueron probados en una población de tortugas golfinas de la India (Aggarwal *et al.*, 2004). Es muy recomendable probar estos nuevos microsatélites en la población de Escobilla, ya que prometen ser útiles y evitarían el uso de Ei8.

## **ANEXO 1. PROTOCOLOS DE LABORATORIO**

### Extracción y preservación de sangre de tortugas marinas (Dutton, 1996)

El método de extracción de sangre de tortugas adultas más utilizado, es el descrito por Owens y Ruíz (1980 en Dutton, 1996), el cual consiste en obtener sangre del seno cervical dorsal.

Para la obtención de la sangre se pueden utilizar jeringas de 3 ml o vacutainers sin ninguna sustancia anticoagulante, se recomiendan agujas de 2.5 a 3.8 cm de largo o de 7.6 cm en el caso de la tortuga laúd. La cabeza de la tortuga tiene que estar a un nivel más bajo que el resto del cuerpo, lo cual se puede lograr excavando la arena debajo de la misma durante la oviposición. La extracción de sangre de una hembra anidando sólo se debe realizar una vez que la misma haya comenzado a depositar los huevos. Se recomienda desinfectar el área con alguna sustancia antiséptica. En el cuello del animal se sienten dos bandas de tendones, la aguja debe ser insertada a un centímetro de distancia de uno de ellos hacia fuera (si se hace hacia dentro se puede dañar la columna vertebral), la aguja debe ser introducida en un ángulo perpendicular a la superficie dorsal del cuello (Figura 10). Una vez introducida, se debe ejercer una ligera succión y ajustar la profundidad de la aguja para ubicar el seno hasta que salga la sangre. El volumen de muestra recomendado es de 1 a 2 ml. Si el seno no es localizado en el primer intento, se debe retirar la jeringa y repetir el procedimiento en una posición más lateral o media.

La muestra debe ser mezclada en el momento con amortiguador lítico en una proporción 1:10 (sangre:amortiguador), se recomienda llevar viales o tubos listos conteniendo 10 ml de amortiguador: EDTA tetrasódico 100mM, Tris 100mM, NaCl 10mM y SDS<sup>5</sup> 1% pes/vol, pH=8.0. Este buffer no es tóxico y puede ser almacenado por periodos extensos a temperatura ambiente.

Se invierte el tubo cuidadosamente varias veces, algunas ocasiones se obtiene una separación parcial de la sangre en la mezcla. Las muestras se pueden almacenar a temperatura ambiente

---

<sup>5</sup> SDS es sodium dodecyl sulfate (= sodium lauryl sulfate).

durante varios meses, o en congelación hasta por más de un año. Se recomienda evitar la exposición de las muestras al calor o la luz solar.

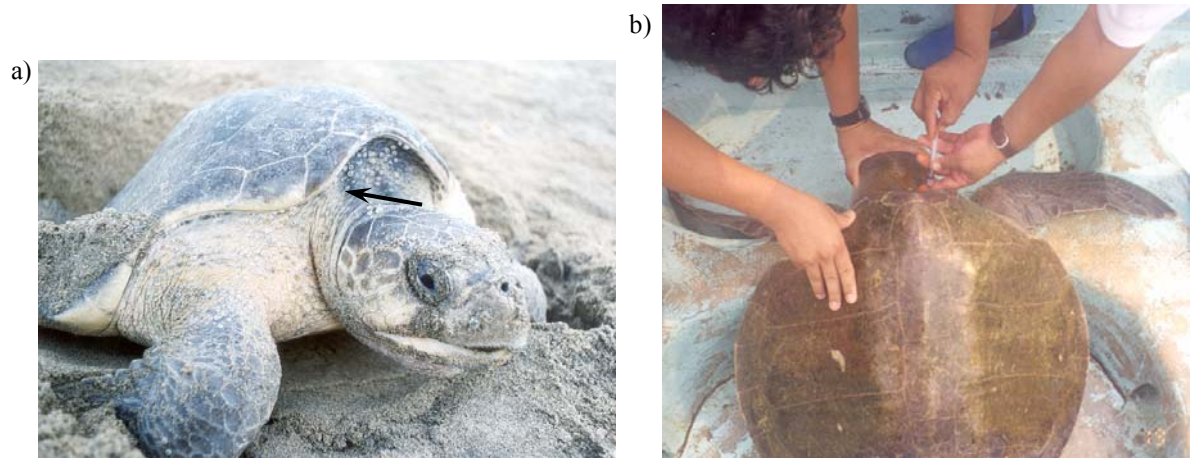


Figura 10. Extracción de sangre a partir del seno cervical dorsal. a) La flecha indica el lugar donde debe insertarse la aguja de la jeringa. b) Vista dorsal del momento de la extracción, la cabeza de la tortuga está a un nivel más bajo que el resto del cuerpo.

Protocolo de aislamiento de ADN total a partir de muestras de sangre preservadas en amortiguador lítico (modificado de Hillis *et al.*, 1990)

Todos los materiales deben ser nuevos y estériles, todo el tiempo se deben usar guantes, el fenol es una sustancia peligrosa que debe manipularse bajo campana de extracción y desecharse adecuadamente.

1. Transferir aproximadamente 300  $\mu$ l de la mezcla sangre:amortiguador a un microtubo de 1.5 ml. Añadir 400  $\mu$ l de STE<sup>6</sup>.
2. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm para peletizar.
3. Con pipeta Pasteur transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml. Descartar el material que queda al fondo.
4. Añadir 700  $\mu$ l de fenol en amortiguador. Mezclar por medio de succión y eyección de la mezcla repetidas veces usando una pipeta Pasteur, incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se observará un color grisáceo homogéneo.
5. Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm.
6. Remover cuidadosamente la fase acuosa (superior) con una pipeta Pasteur. Transferir a un nuevo tubo de 1.5 ml, tratando de no transferir los restos celulares ubicados en la interfase fenol/STE.
7. Si la transferencia de la fase acuosa es impedida por restos celulares, repetir los pasos 4-6.
8. Añadir 700  $\mu$ l de FCI, mezclar suavemente pero por completo e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm.
10. Remover cuidadosamente la fase acuosa (superior) con una pipeta Pasteur. Transferir a un nuevo tubo de 1.5 ml, tratando de no transferir los restos celulares ubicados en la interfase fenol/STE.
11. Reextraer la fase acuosa con FCI (repetir los pasos 8-10).
12. Añadir 700  $\mu$ l de CI, mezclar suavemente e incubar por 5 minutos. Invertir los tubos una vez cada minuto para evitar la separación de las fases.
13. Centrifugar por 3 minutos a 13,000 rpm. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

---

<sup>6</sup> La composición de las sustancias se muestra al final del protocolo.

14. Reextraer la fase acuosa con CI (repetir los pasos 4 y 13).
15. Añadir 1/10 volumen (aproximadamente 50  $\mu$ l) de acetato de sodio 3M y aforar el tubo con etanol 100% frío (10 a 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Agitar bien invirtiendo los tubos varias veces para que se precipite el ADN, es posible que se observe como hilos blancos.
16. Incubar en un congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) o preferiblemente en ultracongelador ( $-70$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) durante 20 minutos.
17. Centrifugar durante 10 minutos con todos los tubos orientados en la misma dirección dentro de la centrífuga y otros 10 minutos rotando los tubos  $180^{\circ}$  (13,000 rpm) preferiblemente bajo refrigeración. Se deberá observar un precipitado pequeño, blanco de ADN en el fondo del tubo.
18. Decantar el alcohol 100%.
19. Enjuagar con 1 ml de etanol 70% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) añadido cuidadosamente. Agitar levemente, centrifugar durante 1 minuto (a temperatura ambiental) y decantar el etanol.
20. Secar el precipitado en una centrífuga con vacío, o volteando los tubos en una gradilla a temperatura ambiental durante 1 hora para evaporar el etanol restante.
21. Resuspender el precipitado en 250  $\mu$ l de TE a  $37^{\circ}\text{C}$ . Puede ser necesario incrementar la temperatura a  $50^{\circ}\text{C}$  si el ADN no se disuelve (en ocasiones es necesario dejar hasta 12 horas a temperatura ambiente).

Soluciones de trabajo:

STE: NaCl 100 mM, EDTA 10mM pH 8.0, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, autoclavar y almacenar bajo refrigeración.

TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5, autoclavar y almacenar bajo refrigeración.

FCI: fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1), almacenar bajo refrigeración.

CI: cloroformo, alcohol isoamílico (24:1), almacenar bajo refrigeración.

Protocolo de electroforesis de secuenciación en geles de poliacrilamida al 5% (modificado de Sigma, 1993).

Preparación de placas.

1. Limpiar minuciosamente las placas con etanol 96% y papel seda, es importante no dejar pelusas o manchas que posteriormente puedan generar burbujas en el gel.
2. Aplicar a la placa larga, con papel seda y con movimientos circulares, una solución adherente preparada con 10  $\mu$ l de silano (gama-metacriloxipropiltrimetoxisilano) en 2 ml de etanol absoluto. Dejar secar por 10 minutos y quitar el exceso con un papel seda seco y limpio. Enjuagar con abundante etanol 70% y secar al aire.
3. Aplicar a la placa corta, con papel seda y con movimientos circulares, 2 ml de una solución antiadherente (Sigmacote de Sigma-Aldrich).

Preparación del gel de poliacrilamida al 5%.

1. Armar el ensamblaje de placas según el modelo de cámara de electroforesis para secuenciación utilizado, en este caso se utilizaron placas de 45 a 50 cm de alto y de 20 a 38 cm de ancho, con separadores laterales de 0.4 mm de grosor.
2. Para un volumen de gel de 50 ml se requieren: 21 g de urea, 5 ml de amortiguador TBE 10X, 6.25 ml de mezcla de acrilamidas (solución al 40% de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida en proporción 19:1), 25 mg de persulfato de amonio, 23.75 ml de agua y 15  $\mu$ l de TEMED (Kit de reactivos para geles desnaturalizantes de ADN de Sigma-Aldrich).
3. Mezclar todos los reactivos excepto el TEMED, se recomienda filtrar la mezcla y degasear al vacío durante dos minutos.
4. Agregar el TEMED y verter lentamente entre las placas de vidrio, evitando la formación de burbujas.
5. Dejar polimerizar por lo menos durante una hora.

Electroforesis.

1. Montar el ensamblaje en el aparato de electroforesis y precalentar hasta que el vidrio alcance una temperatura aproximada de 50°C (para un gel al 5% de 45 x 20 cm y de 0.4

mm de grosor, a una temperatura ambiente de 28°C, se utilizaron 60 W por 50-60 minutos).

2. Mezclar los productos de PCR con amortiguador de carga (mezcla de colorantes -azul de bromofenol y cianol xileno- en formaldehído en una proporción 1:4) en una proporción 1:1.5, calentar la mezcla en baño maría a 95°C por 3 minutos y transferir inmediatamente a hielo frapé. Incluir entre las muestras marcadores de peso molecular.
3. Una vez alcanzada la temperatura de 50°C del ensamblaje, lavar la urea de la parte superior del gel con ayuda de una pipeta Pasteur, aplicar el peine (de dientes de tiburón del grosor de los separadores laterales) y proceder a la carga de muestras con ayuda de una micropipeta utilizando puntas especiales para cargar geles.
4. Correr la electroforesis a un voltaje tal, que las placas de vidrio permanezcan a alrededor de 50°C (para un gel al 5% de 45 x 20 cm y 0.4 mm de grosor, a una temperatura ambiente de 28°C, se aplicaron 35-40 W durante 3 a 6 horas, dependiendo de la longitud de los productos amplificados, entre 140-350 bases).
5. Una vez concluida la corrida, dejar enfriar el ensamblaje hasta que esté tibio, retirar la placa corta, y proceder a la tinción.



Protocolo de tinción con nitrato de plata (Creste *et al.*, 2001).

Preparar los reactivos al momento de usarlos, usar agua de buena calidad (bidestilada y desionizada) y una charola para cada paso. En todos los pasos, excepto en el último, se requiere una suave agitación constante.

<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Preparación de reactivos</b>
Fijación	10 minutos	Etanol (puede ser el comercial de 96°) 10%, ácido acético glacial 1%
Enjuague 1	2 minutos	Agua destilada
Pretratamiento	3 minutos	Ácido nítrico 1.5%
Enjuague 2	1 minuto	Agua destilada
Incubación	30 minutos	Nitrato de plata 0.2%
Enjuagues 3 y 4	30 segundos c/u	Agua destilada
Revelado	Hasta que aparezcan las bandas	Carbonato de sodio 3% y formalina 0.54 ml/L
Detenedor	5 minutos	Ácido acético glacial 5%

### Estimación del tamaño de los fragmentos amplificados, ejemplo con LB121.

1. Incluir en cada corrida electroforética un marcador de peso molecular.
2. Una vez hecha la tinción y que el gel esté seco, marcar una línea horizontal en la parte superior.
3. Medir la distancia entre cada banda del marcador de peso molecular y esta línea. Adicionalmente medir la distancia entre cada banda alélica y la línea marcada.
4. Construir una gráfica del tamaño de las bandas del marcador, en pares de bases, contra la distancia recorrida (ver el ejemplo de la gráfica inferior).
5. Dibujar una curva entre los puntos.
6. Graficar las distancias recorridas por los alelos y determinar su tamaño en pares de bases por interpolación.

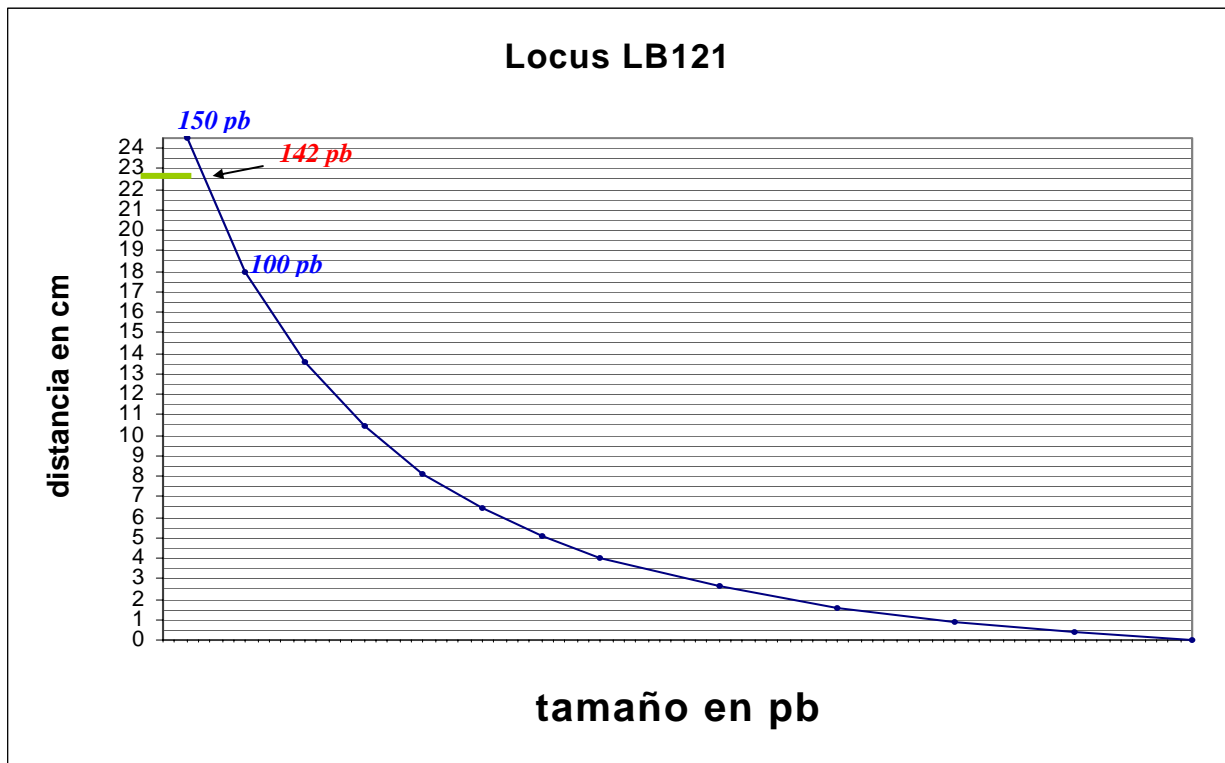


Figura 11. Ejemplo de la estimación del tamaño de los alelos. En azul se muestran los puntos correspondientes a dos de las bandas del marcador de peso molecular, en verde se muestra la distancia recorrida por una banda alélica, y en rojo se muestra su tamaño estimado.

**ANEXO 2. FORMATO DE INGRESO DE DATOS A ARLEQUIN 2.00** (Schneider *et al.*, 2000).

Ejemplo con LB143.

[Profile]

```
Title="Tortugas golfinas de Escobilla"  
  NbSamples= 1  
  DataType= MICROSAT  
  GenotypicData= 1  
  LocusSeparator= TAB  
  GameticPhase= 1  
  RecessiveData= 0  
  RecessiveAllele= null  
  MissingData= '?'
```

[Data]

[[Samples]]

```
      SampleName="LB143"  
      SampleSize= 28  
      SampleData= {  
MS_1  1      194  
              192  
MS_2  1      192  
              192  
MS_3  1      192  
              192  
MS_4  1      192  
              192  
MS_5  1      192  
              192  
MS_6  1      192  
              192  
MS_7  1      192  
              192  
MS_8  1      192  
              192  
MS_9  1      192  
              192  
MS_10 1      192  
              192  
MS_11 1      192  
              192  
MS_12 1      192  
              192  
MS_13 1      192  
              192  
MS_14 1      192  
              192  
MS_15 1      191
```

		191
MS_17	1	191
		191
MS_18	1	192
		192
MS_19	1	192
		192
MS_20	1	194
		192
MS_21	1	192
		192
MS_22	1	192
		192
MS_23	1	192
		192
MS_24	1	192
		192
MS_25	1	192
		192
MS_27	1	192
		192
MS_28	1	192
		192
MS_29	1	192
		192
MS_30	1	192
		192
}		

## LITERATURA CITADA

- Abreu-Grobois, F.A., A.L. Bass, R. Briseño-Dueñas, P.H. Dutton, S.E. Encalada y N.N. FitzSimmons. 1996. Mitochondrial DNA d-loop sequences of marine turtles. *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell (eds.) Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-396.
- Aggarwal, R.K., T.P. Velavan, D. Udaykumar, P.S. Hender, K. Shanker, B.C. Choudhury y L. Singh. 2004. Development and characterization of novel microsatellite markers from olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). Molecular Ecology Notes 4:77-79.
- Ballesteros, J., R. Arauz y R. Rojas. 2000. Management, conservation, and sustained use of olive ridley sea turtle eggs (*Lepidochelys olivacea*) in the Ostional Wildlife Refuge, Costa Rica: an 11 year review. *In*: Abreu-Grobois, F.A., R. Briseño-Dueñas, R. Márquez y L. Sarti (comps.) Proceedings of the Eighteenth International Sea Turtle Symposium. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-436.
- Bass, A.L., D.A. Good, K.A. Bjorndal, J.I. Richardson, Z. Hillis, J.A. Horrocks y B.W. Bowen. 1996. Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. Molecular Ecology 5:321-328.
- Bjorndal, K. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. *In*: Lutz, P.L. y J.A. Musick (eds.) The biology of sea turtles. CRC Press, New York, U.S.A.
- Bollmer, J.L., M.E. Irwin, J.P. Rieder y P.G. Parker. 1999. Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. Copeia 2:475-478.
- Bowen, B.W. y S.A. Karl. 1997. Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. *In*: Lutz, P.L. y J.A. Musick (eds.) The biology of sea turtles. CRC Press, New York, U.S.A.
- Bowen, B.W., A.B. Meylan y J.C. Avise. 1991. Evolutionary distinctiveness of the endangered kemp's ridley sea turtle. Nature 352:709-711.
- Bowen, B.W., A.B. Meylan, J.P. Ross, C.J. Limpus, G.H. Balazs y J.C. Avise. 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. Evolution 46(4):865-881.

- Bowen, B.W., J.C. Avise, J.I. Richardson, A.B. Meylan, D. Margaritoulis y S.R. Hopkins-Murphy. 1993. Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Conservation Biology 7(4):834-844.
- Bowen, B.W., F.A. Abreu-Grobois, G.H. Balazs, N. Kamezaki, C.J. Limpus y R.J. Ferl. 1995. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:3731-3734.
- Bowen, B.W., A.M. Clark, F.A. Abreu-Grobois, A. Chavez, H.A. Reichart y R.J. Ferl. 1998. Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.) as inferred from mitochondrial DNA sequences. Genetica 101:179-189.
- Bowen, B.W., A.L. Bass, A. García-Rodríguez, A. Bolten, C.E. Díez, R. VanDam, K.A. Bjorndal y R.J. Ferl. 1996. Origin of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Caribbean feeding area, as indicated by mtDNA sequence analysis. Ecological Applications 6(2):566-572.
- Briseño-Dueñas, R. 1998. Variación genética en la región control del ADN mitocondrial de poblaciones de tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, en el Pacífico Oriental y las implicaciones para su conservación. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencia Pesquera. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México.
- Brown, W.M., G. Matthew Jr. y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(4):1967-1971.
- Casas-Andreu, G. 1979. Análisis de la anidación de las tortugas marinas del género *Lepidochelys* en México. An. Centro Cienc. del Mar. y Limnol. Univ. Nal. Autón. México 5(1):141-158.
- Creste, S., A. Tulmann Neto y A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter 19:299-306.
- Crim, J.L., L.D. Spotila, J.R. Spotila, M. O'connor, R. Reina, C.J. Williams y F.V. Paladino. 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. Molecular Ecology 11:2097-2106.

- Davis, L.M., T.C. Glenn, R.M. Elsey, H.C. Dessauer y R.H. Sawyer. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. Molecular Ecology 10:1011-1024.
- Diario Oficial de la Federación. 1990. Decreto por el que se establece veda para las especies y subespecies de tortuga marina, en aguas de jurisdicción federal del Golfo de México y Mar Caribe, así como en las del Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California. D. O. F. 31 de mayo de 1990, México.
- Diario Oficial de la Federación. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994 que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección, D.O.F. 16 de mayo de 1994. México.
- Dutton, P.H. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell (eds.) Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-396.
- Dutton, P.H., E. Bixby y S.K. Davis. 2000. Tendency towards single paternity in leatherback detected with microsatellites. *In*: Abreu-Grobois, F.A., R. Briseño-Dueñas, R. Márquez y L. Sarti (comps.) Proceedings of the 18th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. US Dept. Commerce. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-436.
- Esquivel, C., L. Sarti e I. Fuentes. 1993. Primera observación directa documentada sobre la depredación de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* por *Orcinus orca*. Cuadernos Mexicanos de Zoología 1(2):96-98.
- FitzSimmons, N.N. 1996. Use of microsatellite loci to investigate multiple paternity in marine turtles. *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell (eds.) Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-396.
- FitzSimmons, N.N. 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). Molecular Ecology 7:575-584.
- FitzSimmons, N.N., C. Moritz y S.S. Moore. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. Mol. Biol. Evol. 12:432-440.
- FitzSimmons, N.N., C. Moritz, C. Limpus, J.D. Miller, C.J. Parmenter y R. Prince. 1996. Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in

- Australia based on variable mtDNA and nDNA regions. *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell. Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Inst. Geogr. Univ. Nal. Autón. México.
- Goldstein, D.B. y C. Schlötterer (eds.) *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, U.S.A.
- Grupo de Especialistas en Tortugas Marinas (GETM), UICN/CSE. 1995. Estrategia Mundial para la Conservación de las Tortugas Marinas. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN, U.S.A.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutation mechanisms. *In*: Goldstein, D.B. y C. Schlötterer (eds.) *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, U.S.A.
- Hillis, D.M., A. Larson, S.K. Davis y E. A. Zimmer. 1990. Nucleic acids III: Sequencing. *In*: Hillis, D.M. y C. Moritz (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer, U.S.A.
- Hoekert, W.E.J., H. Neufégli, A.D. Schouten y S.B.J. Menken. 2002. Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* 89:107-113.
- Instituto Nacional de Ecología. 1999. Programa nacional de protección, conservación, investigación y manejo de tortugas marinas. INE, SEMARNAP, México, D.F.
- Jarne, P. y P.J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11(10):424-429.
- Kichler, K. 1999. Microsatellites and conservation: Genetic variability and mating behavior of the kemp's ridley sea turtle, *Lepidochelys kempi*. Master Dissertation, Texas A&M University.
- Kichler, K., M.T. Holder, S.K. Davis, R. Márquez y D.W. Owens. 1999. Detection of multiple paternity in the kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology* 8:819-830.
- Levinson, G. y G.A. Gutman. 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4(3):203-221.



- Li, Y-C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles y E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology 11:2453-2465.
- López-Chávez, F. 2000. Determinación de la estructura genética de las poblaciones de tortuga golfinia en el Pacífico Central Mexicano con microsatélites del DNA nuclear. Tesis de Maestría. Universidad de Colima, Colima, México.
- Márquez, R. 1990. FAO Species Catalogue. Vol. 11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Vol. 11, Rome.
- Márquez, R. 1996. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica. Serie "La ciencia desde México". Primera edición. México, D. F.
- Márquez, R., J. Vasconcelos y C. Peñaflores. 1990. XXV años de investigación, conservación y protección de la tortuga marina. Instituto Nacional de la Pesca, Secretaría de Pesca, México.
- Márquez, R., A. Villanueva y C. Peñaflores. 1976. Sinopsis de datos biológicos sobre la tortuga golfinia. Instituto Nacional de Pesca, Sinopsis sobre la Pesca 2:1-61.
- Montenegro-Silva, C., G. Bernal-González y A. Martínez-Guerrero. 1986. Estudio del contenido estomacal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, en la costa de Oaxaca, México. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. México 13(2): 121-131.
- Moore, M.K. y R.M. Ball Jr. 2002. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. Molecular Ecology 11:281-288.
- Moxon, E.R. y C. Wills. 1999. DNA Microsatellites: Agents of evolution? Scientific American 280(1):94-99.
- National Marine Fisheries Service and U.S. Fish and Wildlife Service. 1998. Recovery plan for U.S. Pacific populations of the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*). National Marine Fisheries Service, Silver Spring, M.D.
- Owens, D.W. 1997. Hormones in the life history of sea turtles. *In*: Lutz, P.L. y J.A. Musick (eds.) The biology of sea turtles. CRC Press, New York, U.S.A.
- Peare, T. y P.G. Parker. 1996. The use of multilocus minisatellite DNA fingerprinting to examine local genetic structure within green turtle rookeries. *In*: Bowen, B.W. y W.N.

- Witzell (eds.) Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396.
- Pemberton, J.M., J. Slate, D.R. Bancroft y J.A. Barrett. 1995. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology 4:249-252.
- Peñaflores, C., J. Vasconcelos, E. Albavera y R. Márquez. 2000. Twenty five years nesting of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* in Escobilla beach, Oaxaca, Mexico. *In*: Abreu-Grobois, F.A., R. Briseño-Dueñas, R. Márquez y L. Sarti (comps.) Proceedings of the 18th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. US Dept. Commerce. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-436.
- Pritchard, P.C.H. 1997. Evolution, phylogeny and current status. *In*: Lutz, P.L. y J.A. Musick (eds.) The biology of sea turtles. CRC Press, New York, U.S.A.
- Rosano-Hernández M.C. y C. Deloya. 2002. Interacción entre tróglidos (Coleoptera: Trogidae) y tortugas marinas (Reptilia: Cheloniidae) en el Pacífico Mexicano. Acta Zool. Mex. (n.s.) 87:29-46.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis y H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-494.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.00: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sigma Chemical Co. 1993. DNA denaturing gel reagents kit. Technical bulletin No. MB-150.
- Zar, J.H. 1996. Bioestatistical analysis. Third edition, Prentice Hall, New Jersey, U.S.A.