

UNIVERSIDAD DEL MAR



Estructura genética en tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) del Pacífico tropical mexicano, revelada mediante microsatélites nucleares

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

con especialidad en
ECOLOGÍA MARINA

Presenta:

Biól. André Philippe Samayoa Bonin

Dirigida por:

Dr. Rolando Cardeña López

Codirigida por:

M. en C. Samantha Karam Martínez

*Puerto Ángel, Oaxaca
Abril de 2008*

Puerto Ángel, Oaxaca, a _____ de 2008

C. _____
JEFE DE LA DIVISIÓN DE POSTGRADO
DE LA UNIVERSIDAD DEL MAR
P R E S E N T E

Después de haber analizado y evaluado la tesis “ _____

_____”
_____ “ que presenta el (la) C. _____

Por este conducto, le comunicamos que la tesis _____ cumple con los requisitos académicos para que el (la) citado (a) tesista presente el correspondiente examen profesional.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

A t e n t a m e n t e

Sinodal Secretario

Sinodal Vocal

Sinodal Suplente

Sinodal Suplente

Sinodal Presidente

*À mon fils Nicolas, ma raison de vivre, et Man, toi qui a toujours été à mon côté,
sans toi je ne serai pas arrivé où je suis...*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar, con el apoyo de financiamiento interno. El material biológico fue proporcionado por Kutzari, Asociación para el Estudio y Conservación de las Tortugas Marinas A.C., a través de la Biól. Ana Barragán.

AGRADECIMIENTOS

A nivel académico, agradezco a mi director de tesis, Dr. Rolando Cardeña, por compartir sus excelentes conocimientos; a mi co-directora, M. en C. Samantha Karam, por presentarme el mundo de las tortugas marinas; a los revisores, por sus comentarios sobre la tesis; y finalmente a los profesores de postgrado, por sus valiosas enseñanzas en los dos años de materias.

A nivel personal agradezco aquellos mexicanos y extranjeros que me entregaron su amistad y cariño sin distinción de nacionalidad ni estrato social, estando conmigo en las buenas y en las malas. Su amistad pura fue lo más valioso para mí. Finalmente agradezco a México, un país único en su historia, naturaleza y sobre todo en su gastronomía...

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Generalidades biológicas.....	2
2.2. Problemática.....	3
2.2.1. Estado de las poblaciones.....	3
2.2.2. Fuentes de mortalidad.....	4
2.2.3. Acciones de conservación.....	5
2.3. Estructura poblacional en conservación.....	6
2.3.1. Estructura demográfica.....	7
2.3.2. Estructura genética.....	8
2.3.2.1. Niveles y medidas de variación genética.....	8
2.3.2.2. Tipos de marcadores moleculares.....	9
2.3.2.3. Estadísticos para análisis de estructura genética.....	12
2.4. Estudios moleculares sobre estructura poblacional en tortugas marinas....	14
2.4.1. <i>Chelonia mydas</i>	14
2.4.2. <i>Caretta caretta</i>	16
2.4.3. <i>Eretmochelys imbricata</i>	17
2.4.4. <i>Lepidochelys olivacea</i>	18
2.4.5. <i>Dermochelys coriacea</i>	19
2.5. Justificación.....	20
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo principal.....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1. Material biológico y extracción de ADN.....	24
5.2. Análisis microsatelital.....	25
5.2.1. Amplificación por PCR.....	25
5.2.2. Electroforesis y visualización de ADN.....	26
5.3. Análisis estadístico.....	26
5.3.1. Caracterización de la variación.....	26
5.3.2. Análisis de estructura genética.....	27
5.3.2.1. Informatividad de los loci.....	27
5.3.2.2. Equilibrio Hardy-Weinberg.....	27
5.3.2.3. Índices de fijación y generación del cladograma.....	27

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6. 1. Extracción de ADN.....	28
6. 2. Implementación de los análisis de ADN microsatelital.....	29
6. 2. 1. Amplificación por PCR.....	29
6. 2. 1. 1. Evaluación de temperaturas de hibridación.....	29
6. 2. 1. 2. Evaluación de concentraciones de magnesio.....	31
6. 2. 2. Evaluación de tiempos de electroforesis.....	31
6. 3. Caracterización de la variación.....	33
6. 4. Análisis de estructura genética.....	37
6. 4. 1. Informatividad de los loci.....	37
6. 4. 2. Equilibrio Hardy-Weinberg.....	37
6. 4. 3. Análisis de frecuencias alélicas.....	39
6. 4. 4. Índices de fijación y cladograma.....	42
7. CONCLUSIONES.....	46
8. REFERENCIAS.....	47
9. ANEXO: PRUEBAS DE ROBUSTEZ.....	53
9. 1. Análisis de los genotipos de OR-2, OR-4, OR-7, OR-8/LB1 y OR-8/LB2.....	53
9. 2. Análisis de las frecuencias alélicas de OR-2, OR-4, OR-7 y OR-8/LB1.....	53
9. 3. Análisis de los genotipos de OR-2, OR-4, OR-7 y OR-8/LB1.....	54
9. 4. Análisis de las frecuencias alélicas de OR-4, OR-7, OR-8/LB1 y OR-8/LB2....	55
9. 5. Análisis de los genotipos de OR-4, OR-7, OR-8/LB1 y OR-8/LB2.....	55
9. 6. Análisis de las frecuencias alélicas de OR-4, OR-7 y OR-8/LB1.....	56
9. 7. Análisis de los genotipos de OR-4, OR-7 y OR-8/LB1.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Ubicación geográfica de las playas de estudio.....	24
2. Estados de calidad del ADN extraído.....	28
3. Productos de PCR para los distintos loci, en una muestra de laúd (L) y una de golfinia (G).....	30
4. Efecto de reducir la temperatura de hibridación, sobre los patrones de bandeo de los loci evaluados.....	30
5. Efecto de reducir la concentración de Mg^{+2} , sobre los patrones de bandeo de tres loci.....	31
6. Patrones de bandeo en geles de poliacrilamida para los loci analizados, a tres tiempos de separación.....	32
7. Patrones de bandeo para los loci amplificados.....	34
8. Frecuencias alélicas por colonia y globales.....	40
9. Frecuencias alélicas que muestran gradientes relacionados con la distancia geográfica.....	41
10. Correlación entre distancia geográfica y distancia genética.....	43
11. Cladograma basado en frecuencias alélicas utilizando el algoritmo de unión al vecino.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
I. Secuencias de los iniciadores y concentraciones en las que se usaron.....	25
II. Cantidad de muestras de sangre, y de extractos de ADN útiles, por localidad...	28
III. Número de alelos y tamaños respectivos en los loci analizados.....	35
IV. Heterocigosidades para los distintos loci y localidades.....	36
V. Valores de P asociados a las pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg.....	38
VI. Matriz de F_{ST} generada del análisis de frecuencias alélicas.....	42

RESUMEN

La tortuga laúd es una especie en peligro de extinción, y sus anidaciones en México han disminuido drásticamente desde 1982 lo que enfatiza la necesidad de estrategias para su conservación especie. Dichas estrategias se están aplicando en playas de Michoacán, Guerrero y Oaxaca, en donde se registran los mayores números de anidaciones. Las técnicas moleculares han sido una herramienta muy útil para la identificación de unidades de manejo en tortugas marinas. En este sentido, la variación de microsátélites nucleares permite una mejor resolución que otros marcadores moleculares para distinguir poblaciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estructura genética en las principales colonias anidadoras de laúd del Pacífico tropical mexicano con base en la variación de microsátélites nucleares. El ADN fue extraído de muestras de sangre colectadas en la temporada 1997-1998 en playas de Michoacán (Mexiquillo), Guerrero (Tierra Colorada) y Oaxaca (Cahuitán, Chacahua y Barra de la Cruz). Se aplicó reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores heterólogos en 53 extractos, para amplificar los loci OR-1, OR-2, OR-4, OR-7 y OR-8. El polimorfismo fue caracterizado y usado para evaluar estructura genética. La amplificación de OR-8 reveló dos loci polimórficos. Excepto por OR-1, los demás loci también resultaron polimórficos. El número de alelos por locus varió de 2 a 7, con un promedio de 4,2, lo cual se consideró adecuado para los análisis de estructura genética. A nivel global, dos de los cinco loci se desviaron significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg por un déficit en heterocigotos. Además, todos los valores de F_{ST} fueron significativos. Seis de los 21 alelos presentaron un gradiente de frecuencia relacionado con la ubicación geográfica de las colonias, y las distancias geográficas estuvieron fuertemente correlacionadas ($R^2 = 0,83$) con las genéticas. El cladograma fue consistente con esta correlación, al mostrar a Mexiquillo y Barra de la Cruz, las colonias más alejadas geográficamente, como las más distantes genéticamente, resultado que se mantuvo en cladogramas generados con un número menor de loci. Estos resultados revelan una estructura genética leve en las colonias de laúd del Pacífico mexicano, y señalan a la distancia geográfica como una fuente de diferenciación genética en esta región.

1. INTRODUCCION

Las tortugas marinas juegan un papel ecológico importante en el medio marino. Siendo consumidores secundarios, regulan los niveles tróficos inferiores y superiores. Sin embargo, la tortuga laúd se distingue de las demás especies por poseer características taxonómicas y morfo-anatómicas únicas. Esta especie, única representante de la familia Dermochelyidae, es la más grande, pesada, migratoria y pelágica de las siete reconocidas en la actualidad.

Sus poblaciones han disminuído drásticamente en las últimas dos décadas. En la actualidad, cerca de la mitad de las anidaciones de laúd ocurren en playas de los estados de Michoacán, Guerrero, y Oaxaca.

En el marco de la conservación, los recursos naturales se monitorean con base en unidades de manejo. Cada una de éstas representa una población o stock con características ecológicas y genéticas únicas. Estas unidades se han delimitado con gran confianza con base en herramientas moleculares mediante análisis de estructura genética. Cada población se distingue por su variación genética única, por lo que resulta útil analizar secuencias de ADN que presenten una alta variabilidad. Las principales secuencias con esta característica son repeticiones de pares de nucleótidos en el ADN nuclear, conocidas como microsatélites nucleares.

Debido al bajo número de anidaciones actuales en el Pacífico mexicano, las principales colonias anidadoras de laúd requieren de un monitoreo basado en unidades de manejo. Por lo tanto, es necesario definir si cada playa de anidación representa una unidad de manejo distinta. Con el fin de definir stocks reproductores de laúd en México, resalta entonces la importancia del análisis de su estructura genética con base en microsatélites nucleares.

El propósito general del trabajo fue determinar la estructura genética en las principales colonias anidadoras de laúd del Pacífico tropical mexicano, con base en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de cinco loci microsatelitales nucleares que habían sido caracterizados en tortugas golfinas.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Generalidades biológicas

Las tortugas marinas aparecieron durante el Jurásico hace 200 millones de años, agrupadas en la familia Thalassemyidae (Pritchard, 1997). Fue hasta el Cretácico, hace 100 millones de años, que divergieron cuatro familias, dos de las cuales permanecen en la actualidad: Cheloniidae y Dermochelyidae. Actualmente existen siete especies, siendo la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) la única representante de la segunda familia (Spotila, 2004).

La laúd es la tortuga marina más grande (130-183 cm de largo curvo de caparazón) y más pesada (200-600 kg) (Pritchard, 1971). Se caracteriza por la ausencia de escamas y uñas en las aletas. El caparazón está formado por placas óseas parcialmente unidas, sobre las cuales se encuentra una piel espesa rica en aceite (Pritchard, 1997). El esqueleto está constituido por una mezcla de tejido óseo y cartilaginoso (Rhodin *et al.*, 1981).

Esta especie presenta un eficaz sistema circulatorio a contracorriente (Frair *et al.*, 1972), lo que le permite ser la más migratoria, registrándose individuos entre los 40°N y 35°S (Sternberg, 1981), y la más pelágica, detectándose organismos hasta 1 300 m de profundidad (Eckert *et al.*, 1989). Los movimientos de la laúd resultan de la búsqueda de alimento, esencialmente medusas (Pritchard, 1984). Dado su gran tamaño, la laúd satisface sus necesidades energéticas consumiendo un gran número de éstas (Lutcavage y Lutz, 1986).

La temporada de anidación en el Pacífico es de octubre a marzo (Márquez *et al.*, 1981). En una temporada, una hembra deposita siete nidos en promedio (Spotila, 2004), cada uno conteniendo entre 60 y 120 huevos (Binckley *et al.*, 1998). Los últimos 10 a 40 carecen de embriones, siendo la especie que presenta la tasa de eclosión más baja (aproximadamente 50%) de todas las tortugas marinas (Spotila, 2004). Las hembras de laúd se caracterizan por su baja fidelidad al sitio de anidación, consecuencia de su comportamiento altamente migratorio (Plotkin, 2003).

Un aspecto poco conocido de su sistema de reproducción es el apareamiento. Carr y Carr (1986) detectaron que los individuos se aparean durante la migración hacia las zonas de reproducción, antes de la temporada de anidación. Con base en datos genéticos, Crim *et al.* (2002) encontraron la misma conclusión para la colonia de Playa Grande, Costa Rica. Sin embargo, para la misma colonia, Pickrell (2004) observó un apareamiento entre anidadas en una misma temporada. Fijando una cámara al caparazón de una hembra, observó que ésta fue perseguida por varios machos al entrar al mar después de anidar. El macho que se apareó con ella, la mordió en el caparazón y las aletas, agrediendo a los machos que se acercaban. Sin embargo este comportamiento agresivo no implica que el apareamiento sea forzado.

Los estudios biológicos de la laúd en los últimos años se han visto limitados por tamaños de muestra pequeños. En efecto, el número de organismos ha disminuído de manera general. Sin embargo las dinámicas poblacionales varían drásticamente entre regiones oceánicas.

2. 2. Problemática

2. 2. 1. Estado de las poblaciones

La tortuga laúd ha sido catalogada como en “Peligro Crítico de Extinción” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN, por sus siglas en inglés) (Godley y Broderick, 2001). Esta clasificación resulta del decaimiento del número de hembras de 115 000 en 1980 (Pritchard, 1982) a 34 500 en 1996 (Spotila *et al.*, 1996).

En el Océano Atlántico, Spotila *et al.* (1996) califican a las poblaciones como estables, por lo que en la actualidad constituyen la agrupación más importante de tortugas laúd en el mundo. Además, los autores afirman que las colonias de Trinidad y Tobago, Saint-Croix de las Islas Vírgenes y África del Sur han aumentado en los últimos años. La colonia más numerosa es la de la Guayana Francesa y Surinam, con 13 800 hembras en cada temporada (Spotila, 2004).

En el Océano Índico, Spotila *et al.* (1996) describen una dinámica opuesta, ya que la mayoría de las poblaciones ha sido extirpada, como es el caso de India y Tailandia. Asimismo, dichos autores afirman que la mayor agrupación de hembras se localizaba en Sri Lanka durante la primera mitad del siglo XX, pero decayó a menos de 100 hembras para la segunda mitad. Limpus (1995) reporta que en Malasia, de las 3 103 hembras registradas en 1968, solamente dos anidaron en 1994.

En el Océano Pacífico, las poblaciones están disminuyendo, con dos colonias importantes, una en Costa Rica y la otra en México (Spotila *et al.*, 1996). La primera es la más estable del Pacífico, ya que en cada temporada se registran entre 59 y 435 hembras (Spotila, 2004). La segunda constituyó la concentración más importante de individuos de la especie en el mundo ya que de las 115 000 hembras estimadas para las poblaciones mundiales en 1980, más de 50 000 anidaban en las costas del Pacífico de México (Pritchard, 1982). Sin embargo, estas colonias se están colapsando ya que en la temporada 1995-1996 menos de 1 000 nidadas se registraron en el Pacífico mexicano (Sarti *et al.*, 1996). En consecuencia, la laúd se clasifica en México como en “Peligro de Extinción” bajo la norma NOM-059-SEMARNAT-2001 (Sarti, 2004). Sarti-Martínez *et al.* (2007) muestran que, aunque las anidaciones de laúd ocurren desde Baja California Sur hasta Chiapas, el 42% de las nidadas de una temporada se registran en playas de Michoacán (Mexiquillo), Guerrero (Tierra Colorada) y Oaxaca (Cahuitán y Barra de la Cruz). Por la gran concentración de nidadas y las altas densidades de nidos por kilómetro de playa en una temporada, dichas playas son calificadas por los autores como “playas índice”.

El estado actual de las poblaciones de tortuga laúd es consecuencia del impacto de distintas fuentes de mortalidad. Dichas fuentes pueden considerarse como naturales o antropogénicas, siendo éstas las de mayor impacto (Sarti, 2004).

2. 2. 2. Fuentes de mortalidad

La tortuga laúd está sujeta a selección natural por la depredación de sus huevos por mamíferos, insectos y crustáceos, así como de los juveniles por aves, peces menores y mayores (Lutz y

Musick, 1997). En adultos, Sarti *et al.* (1994) reportaron un caso de depredación por una orca, mientras que Troeeng (2000) observó ataques por jaguares durante la anidación y tiburones. En los últimos años, una intensa presión de selección antropogénica se ha sumado a la selección natural, razón principal de la disminución de la población en México (Sarti *et al.*, 1996). Los principales factores han sido la modificación de las playas de anidación y la explotación ilegal de los huevos (Spotila *et al.*, 1996).

Sin embargo, James *et al.* (2005) enfatizan que se han ignorado las fuentes de mortalidad en el mar. Los autores detectaron por telemetría que la mayoría de los sub-adultos del Atlántico Occidental migran a lo largo de las costas americanas, por lo que concluyeron que el mayor riesgo para las tortugas en el mar es la pesca costera, tanto en zonas templadas como tropicales. Otra fuente de mortalidad son las capturas incidentales en las zonas de alimentación (Sarti, 2002). Los individuos de las colonias de México y Costa Rica migran a la zona de surgencia frente a la costa del Perú para alimentarse (Sarti, 2004). El uso de redes de enmalle en estas áreas ha provocado la captura incidental de tortuga laúd, aunque también se reportan capturas dirigidas. Estas actividades persisten en la actualidad pese a que la legislación peruana las prohíbe desde 1976 (FAO, 2004).

Dado el fuerte impacto de las fuentes antropogénicas de mortalidad, se han tomado acciones de conservación dirigidas hacia la limitación de dicho impacto en las dinámicas poblacionales.

2. 2. 3. Acciones de conservación

A fin de proteger a la laúd, se han creado dos campos de acción. El primero pretende proteger a la población de reproductores en las áreas de alimentación al modificar las artes de pesca y regular las capturas incidentales. La FAO (2004) ha recomendado el uso de anzuelos circulares en los palangres pelágicos, así como de Dispositivos Excluidores de Tortugas (TED, por sus siglas en inglés) en redes de arrastre. Sin embargo, el alto costo de un TED impide su implementación generalizada en la actividad pesquera (Spotila, 2004).

El segundo campo de protección ocurre en las playas, y su objetivo es evitar la explotación de los huevos. En México, se han instalado campamentos de protección en las playas índice, en los que se monitorean las anidaciones, registrando parámetros ecológicos, recuperando huevos y liberando crías. Estas actividades se llevan a cabo desde hace 20 años en el país (Sarti, 2004). Los conocimientos y experiencia almacenados en los campamentos son información útil para cualquier estudio enfocado en la ecología y conservación de la laúd.

En la actualidad, los trabajos sobre conservación de la especie contemplan el uso de métodos para delimitar poblaciones (Karl y Bowen, 1999). De esta manera, se determina si distintas colonias anidadoras forman una misma población o si son poblaciones diferentes. Así, se sabría si la pérdida de organismos en una colonia afecta o no la dinámica poblacional de otras (Schierwater *et al.*, 1997). La delimitación de poblaciones requiere por lo tanto de un análisis de estructura poblacional.

2. 3. Estructura poblacional en conservación

Las especies en peligro de extinción son recursos naturales que requieren de un manejo adecuado para conservarlas. En este marco, el recurso natural a proteger se organiza en Unidades de Manejo (MU, por sus siglas en inglés) (Moritz, 1994). Para Frankham *et al.* (2002), una MU puede representar una especie, sub-especie o población. En el último caso, cuando varias poblaciones de una especie presentan diferencias adaptativas en nichos distintos, o cuando presentan diferencias genéticas significativas, dichas poblaciones son MUs distintas. En estos casos, la delimitación de una MU permite un monitoreo más organizado del recurso natural (Dethmers *et al.*, 2006), por lo que es necesario aplicar métodos para diferenciar poblaciones. Las poblaciones naturales se estructuran demográficamente y genéticamente, por lo que existe un método demográfico (o método directo) y uno genético (o indirecto) para diferenciarlas (Slatkin, 1987).

2. 3. 1. Estructura demográfica

El método directo se basa en la definición ecológica de “población”, la cual es un grupo de individuos de una misma especie que se reproducen entre ellos, caracterizado por una estructura de edades estable y parámetros poblacionales determinados (tasas de natalidad, mortalidad, inmigración y emigración) en un tiempo y espacio dados (Krebs, 1985). En tortugas marinas, los datos de estructura de edad, natalidad, mortalidad y migración se obtienen marcando los organismos según el método de captura-recaptura (Dethmers *et al.*, 2006).

La estructura de edad es definida por Wilson y Bosser (1971) como la distribución de los individuos de la población en clases de edad. Para los autores, se alcanza una distribución de edad estable en un ambiente estable: la proporción de individuos de cada clase es constante en el tiempo. Sin embargo, en tortugas marinas, dicha proporción no es constante a causa de la pesca incidental. Además, se sabe muy poco de lo que ocurre con los neonatos y juveniles, etapas denominadas “años perdidos” (Spotila, 2004). Dado que la estructura de edades no es estable y la información sobre neonatos es casi nula, es muy difícil caracterizar la estructura de edades en tortugas marinas por medio de marcajes.

La FAO (1992) hace una recopilación de los métodos de estimación de las tasas de natalidad y mortalidad: la primera se estima con base en datos de fertilidad y sobrevivencia de reproductoras y neonatos, mientras que la segunda con base en datos de crecimiento y edad. En la recopilación se señala la dificultad para obtener dichos datos con marcajes ya que se necesitan series de tiempo muy largas. Asimismo, las estimaciones de inmigración y emigración se basan en marcajes a largo plazo, lo cual es muy oneroso (Dethmers *et al.*, 2006).

El método de captura-recaptura ha sido un método muy costoso, largo y con bajos rendimientos para delimitar poblaciones (Slatkin, 1987). Por lo tanto, en los últimos años se ha privilegiado la caracterización de la estructura genética. De esta manera, Moritz (1994) y Waples (1995) definen una MU como una Unidad Evolutivamente Significativa (ESU, por sus siglas en inglés), correspondiente a una población con una trayectoria evolutiva independiente y aislada de otras. El método indirecto, es decir, el análisis de la variación genética entre poblaciones, ha sido

ampliamente usado para la delimitación de MUs en tortugas marinas en los últimos años (Karl y Bowen, 1999; Roberts *et al.*, 2004; Bowen *et al.*, 2005; Reece *et al.*, 2005; Dethmers *et al.*, 2006).

2. 3. 2. Estructura genética

2. 3. 2. 1. Niveles y medidas de variación genética

El análisis de estructura genética requiere de técnicas y herramientas que detecten variación genética entre poblaciones de una misma especie (Avice, 1994). La variación genética se define como la variación de características heredables, la cual es detectable a distintos niveles (Hartl y Clark, 1997).

El nivel más fino para revelar la variación genética, se basa en el análisis de secuencias nucleotídicas. La caracterización de esta variación se ha facilitado por el desarrollo de las técnicas de secuenciamiento en los últimos años (Futuyma, 1998). En este marco, una medida de diversidad genética es el polimorfismo en nucleótidos θ , proporción del número de nucleótidos polimórficos en una secuencia dada. Otra medida es el parámetro π , número promedio de nucleótidos que difieren entre todos los pares posibles de secuencias. Sin embargo, no siempre es posible conocer la secuencia exacta de una región genómica ya que la técnica de secuenciamiento es muy laboriosa y costosa (Avice, 1994).

La variación genética a nivel del ADN puede caracterizarse sin necesariamente conocer toda la secuencia de la región de interés. Para comprender estos análisis es importante revisar algunas nociones básicas. Primero, el sitio que ocupa un gen, o secuencia codificante, en un cromosoma se define como "locus". Segundo, toda mutación en un gen genera variantes denominadas "alelos" los cuales pueden tener efectos fenotípicos. En la práctica, ambas definiciones se han ampliado a secuencias no codificantes y es en este sentido que se usarán ambos términos en este reporte. En organismos diploides, cada individuo se caracteriza por la combinación de dos alelos por locus, o genotipo. De esta manera, es posible caracterizar la variación genética a nivel de alelos, la cual surge como consecuencia de la variación

nucleotídica. En el marco de la variación alélica, las medidas más sencillas de variación son el número promedio de alelos por locus y las frecuencias alélicas (Futuyma, 1998). Otra medida es el polimorfismo **P**, que corresponde a la proporción de loci polimórficos analizados. En general, un locus se define como polimórfico cuando presenta más de un alelo, y si el alelo más común presenta una frecuencia menor a 0,95 (Hartl y Clark, 1997). Pero la principal medida de variación es la heterocigosidad **H**, definida como la proporción de heterocigotos en un locus para una población. Un heterocigoto se define como un organismo que presenta dos alelos distintos. Este se opone a un homocigoto que presenta alelos idénticos. El valor de **H** depende de las frecuencias p_i de cada iésimo alelo de dicho locus:

$$H = 1 - \sum (p_i^2)$$

La independencia de la información de cada locus a la estructura genética se mide con la prueba de desequilibrio en el ligamiento, la cual determina si la coaparición de los alelos de dos loci se debe al azar o no (Futuyma, 1998). Asimismo, es posible obtener información acerca de la estructuración genética al realizar pruebas del equilibrio Hardy-Weinberg, el cual supone que un locus no está sujeto a fuerzas evolutivas (e.g. flujo génico que rompe la estructuración genética) (Hartl y Clark, 1997).

En esta sección se presentaron medidas de variación genética que pueden usarse para analizar secuencias nucleotídicas, o información alélica que no involucre datos de secuencia. Los datos de este tipo, denominados marcadores moleculares, presentan una alta variación que permite distinguir organismos o poblaciones (Kahl, 2001). En la siguiente sección se presentarán los principales criterios de clasificación de los marcadores moleculares.

2. 3. 2. 2. Tipos de marcadores moleculares

Los marcadores moleculares permiten distinguir especies, poblaciones de una especie y/o individuos de una población (Avisé, 1994). Dada la alta variabilidad de las aplicaciones del análisis molecular, en esta sección se hará referencia a la aplicación de los marcadores en

estructura genética. En este marco, existen muchos tipos de marcadores moleculares y técnicas asociadas, por lo que se presentarán criterios de clasificación de estos marcadores.

Tipo de genoma

Los marcadores pueden pertenecer al ADN mitocondrial (ADNmt) o al nuclear (ADNn). En vertebrados, la tasa de evolución del genoma mitocondrial es entre cinco y diez veces mayor al de secuencias en copia sencilla del ADNn (Brown *et al.*, 1979). Dentro del ADNmt, sobresale la mayor tasa de evolución de la región de control, única región del genoma no codificante (Awise, 1994). Por el alto polimorfismo del ADNmt, los marcadores mitocondriales son muy útiles en análisis de estructura genética. Sin embargo, su mayor desventaja es que caracterizan sólo los linajes maternos, ya que en animales las mitocondrias son generalmente transmitidas vía materna (Futuyma, 1998).

En cambio, el ADNn es heredado por ambos padres, por lo que el análisis de marcadores nucleares evidencia la contribución de ambos sexos en la estructura genética (Awise, 1994). Asimismo, el ADNn presenta ciertas secuencias con una tasa de evolución tan rápida como el ADNmt (Roberts *et al.*, 2004). Por estas dos características, en análisis de estructura genética ciertas secuencias de ADNn son más informativas que el ADNmt.

Número de copias

En el ADNn, se distinguen las secuencias en copias múltiples y en copias sencillas (ADNncs) (Awise, 1994). Las primeras son denominadas ADN repetitivo y pueden ser clasificadas en tres grupos: ADN altamente, moderadamente y poco repetitivo (Nei, 1987).

El ADN altamente repetitivo consiste en secuencias nucleotídicas cortas repetidas en tándem en el genoma (Futuyma, 1998). Sobresalen los microsatélites, los cuales son secuencias constituidas por unidades de dos, tres o cuatro nucleótidos repetidas entre cuatro y seis veces (Schlötterer, 1998). Son regiones nucleares con una alta tasa de evolución y por lo tanto altamente polimórficas, siendo así muy útiles en análisis poblacionales (Dean y Milligan, 1998). Las regiones más representativas del ADN moderadamente y poco repetitivo, según Awise

(1994), son genes codificantes para ARNr y ARNt, los cuales son secuencias altamente conservadas. Para el autor, la baja variabilidad de dichas secuencias les confiere una ventaja para analizar procesos macroevolutivos.

El ADNncs se conforma de secuencias en una sólo copia en todo el genoma nuclear. La principal característica del ADNncs es su herencia mendeliana, en la que es posible determinar genotipos en organismos diploides, distinguiendo los heterocigotos de los homocigotos, y por lo tanto medir la variación genética por medio de la heterocigosidad y el número de alelos (Awise, 1994). Estas medidas de variación son muy sencillas de calcular, por lo que el análisis de ADNncs facilita y hace más robustos los análisis de estructura genética.

Técnica de análisis

En los últimos años, nuevas técnicas han surgido para analizar ácidos nucleicos. Karp y Edwards (1997) presentan y discuten una guía sencilla de las distintas metodologías en la que separan los marcadores moleculares según el uso o no de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta sección está basada en el esquema de clasificación de estos autores.

La PCR ha sido una técnica innovadora que permite la amplificación exponencial *in vitro* de una región genómica mediante el uso de iniciadores que se alinean a las regiones flanqueantes de la secuencia de interés (Dieffenbach y Dveksler, 1995). La amplificación ocurre en un número determinado de ciclos térmicos, cada uno con las mismas tres etapas: desnaturalización del ADN doble cadena, hibridación de los iniciadores y extensión con oligonucleótidos por una polimerasa termoestable.

El grupo de técnicas que no se basan en la PCR pueden hacer uso de la hibridación (e.g. RFLP). En ésta, el ADN molde es puesto en presencia de sondas que son complementarias con regiones específicas del ADN molde. La ventaja de estas técnicas es que evidencian marcadores codominantes, es decir, que permiten distinguir los heterocigotos de los homocigotos, lo cual es útil en estudios poblacionales. Sin embargo, son metodologías que consumen mucho tiempo, pueden requerir el uso de radiactividad para detectar las sondas y es necesario conocer las secuencias específicas del ADN molde a fin de sintetizar las sondas.

El grupo de técnicas que se basan en la PCR son separadas en dos subgrupos, ambos se distinguen según la especificidad de la amplificación, la cual depende de la longitud de la secuencia de los iniciadores así como de las condiciones de astringencia durante la PCR. El primer subgrupo agrupa técnicas que amplifican regiones genómicas al azar en condiciones bajas de astringencia. Este subgrupo reúne las técnicas denominadas MAAP (e.g. RAPD, DAF, AP-PCR), en las que la amplificación es totalmente azarosa usando un solo iniciador de secuencia corta. La rapidez y sencillez de estas técnicas son su mayor ventaja. Sin embargo, su informatividad en análisis de estructura genética es limitada ya que revelan principalmente marcadores de tipo dominante, es decir, que no permiten discernir los heterocigotos de los homocigotos. Este subgrupo también incluye técnicas menos azarosas en cuanto a la especificidad de la amplificación, pues utilizan iniciadores cuya secuencia está basada en sitios de restricción o ADN repetitivo (e.g. AFLP y MP-PCR). También en estos casos, la amplificación de marcadores codominantes es rara, y en la práctica resulta muy difícil detectar variación alélica.

El segundo subgrupo reúne técnicas de amplificación que utilizan pares de iniciadores que se alinean a regiones flanqueantes de una secuencia específica en condiciones de astringencia alta. En estos casos, es necesario conocer la secuencia de dichas regiones flanqueantes para sintetizar los iniciadores. Sin embargo, estas técnicas permiten analizar de manera rápida y sensible marcadores codominantes, los cuales son más informativos en análisis de estructura genética. Los microsatélites nucleares amplificados mediante PCR son un ejemplo de este tipo de marcadores, y son de gran utilidad en estudios de estructura genética. Estos estudios se apoyan en diversos análisis estadísticos, los cuales son presentados en la siguiente sección.

2. 3. 2. 3. Estadísticos para análisis de estructura genética

Los datos generados de los análisis de marcadores moleculares forman la base de estadísticos que caracterizan la estructura genética. Dada la utilidad de los marcadores microsatelitales así

como de la PCR en estructura poblacional, en esta sección se presentan estadísticos poblacionales relacionados con dicho tipo de marcadores.

La medida de variación genética observada entre poblaciones más frecuentemente usada es el índice de fijación F_{ST} (Futuyma, 1998). Al caracterizar el número de alelos amplificados, y sus frecuencias alélicas, es posible calcular la heterocigosidad promedio de cada población. Por ejemplo, para dos supuestas poblaciones P1 y P2, se mide la variabilidad microsatelital obteniendo las respectivas heterocigosidades **H1** y **H2**. A fin de determinar si P1 y P2 son dos poblaciones distintas, se calcula el estadístico F_{ST} tal que:

$$F_{ST} = \frac{Ht - Hs}{Ht}$$

La heterocigosidad Ht es la esperada si P1 y P2 son una población única, con individuos de P1 y P2 apareándose al azar. La heterocigosidad Hs es el promedio de **H1** y **H2**, en caso de que P1 y P2 sean poblaciones diferentes. El índice F_{ST} es una medida de la reducción proporcional en heterocigotos de la metapoblación debido a la subdivisión de P1 y P2 (término “ $Ht - Hs$ ”) con respecto a la hipótesis de “no división” (término “ Ht ”) (Conner y Hartl, 2004). El F_{ST} varía de 0 a 1. Cuando F_{ST} es igual a cero, Hs es igual a Ht : la proporción en heterocigotos promedio entre P1 y P2 es la misma que la de una población panmíctica. Cuando F_{ST} es diferente de cero, Hs es diferente de Ht : la heterocigosidad promedio es diferente de la esperada para una población única, y las poblaciones serían significativamente diferentes. En este caso, demostrar que F_{ST} es significativamente diferente de cero es demostrar que el grupo de poblaciones analizadas está realmente subdividido (Conner y Hartl, 2004). Otros autores han descrito análogos del F_{ST} , como el R_{ST} (Nei, 1987) y el G_{ST} (Gaggiotti *et al.*, 1999).

El grado de diferenciación genética entre poblaciones es cuantificable mediante índices de similitud (e.g. estadístico I de Nei) o disimilitud genética, siendo los últimos definidos como distancias genéticas (e.g. estadístico D de Nei y distancia de Reynolds) (Futuyma, 1998). Nei (1987) discute las principales características de estas distancias. Éstas se anulan cuando dos poblaciones presentan las mismas frecuencias alélicas, por lo que, por definición, el índice de

fijación es un ejemplo de distancia genética. Estas distancias pueden traducirse gráficamente en ramas de árboles filogenéticos, o cladogramas, representando así las relaciones entre grupos de organismos. La construcción de dichos cladogramas puede realizarse, entre otros, con un algoritmo del método de distancias, el cual es uno de los varios métodos de generación de árboles. El algoritmo del Neighbor-Joining es útil cuando las tasas de evolución no son constantes en cada rama divergente (Saitou y Nei, 1987).

Dada la rapidez, facilidad y relativo poco costo de la delimitación indirecta de poblaciones, las herramientas de genética molecular han sido ampliamente utilizadas en los últimos años para estudios de estructura genética en tortugas marinas. Los principales trabajos en este ámbito se presentan en la siguiente sección.

2. 4. Estudios moleculares sobre estructura poblacional en tortugas marinas

La estructura genética ha sido ampliamente estudiada en tres de las siete especies de tortugas marinas: tortuga verde (*Chelonia mydas*), caguama (*Caretta caretta*) y carey (*Eretmochelys imbricata*). La golfina (*Lepidochelys olivacea*) y laúd han recibido una menor atención. Sin embargo, no existen estudios rigurosos sobre las tortugas kikila (*Natator depressus*) y lora (*Lepidochelys kempii*), endémicas de Australia y del Golfo de México respectivamente, probablemente por su distribución restringida. Por ello, a continuación se discuten los principales trabajos realizados en este campo.

2. 4. 1. *Chelonia mydas*

El interés por conocer la estructura genética de esta especie ha sido abordado mediante el análisis de secuencias genómicas tanto de origen mitocondrial como nuclear, y estudiando sus poblaciones ya sea a nivel global o regional. Los trabajos que analizaron la especie a una escala global son tres. Éstos incluyeron como objetivo el complementar los resultados obtenidos con

distintos tipos de marcadores moleculares, y se basaron en el análisis de prácticamente los mismos individuos. Los trabajos que analizaron la especie a nivel regional son tres también, y se enfocaron en el Atlántico, suroeste del Océano Índico, y suroeste del Pacífico.

Bowen *et al.* (1992) analizaron la filogeografía de la especie mediante el análisis de RFLPs del ADNmt. Las colonias del Atlántico estuvieron fuertemente diferenciadas respecto a las del Indo-Pacífico. Para los autores, la barrera geográfica que representó el istmo centroamericano al surgir hace tres millones de años, así como las barreras oceánicas que han representado las aguas frías en las puntas sureñas de América y África, han limitado el flujo génico entre ambas cuencas. A nivel intraoceánico el flujo génico entre colonias estuvo fuertemente limitado, por lo que los autores concluyeron que cada colonia debe ser manejada como una unidad demográfica distinta.

Karl *et al.* (1992) analizaron cinco loci de ADNncs por PCR-RFLP. Un punto de interés del estudio fue la caracterización del patrón de estructura con ADNn y compararlo con el de ADNmt que se discutió en el párrafo anterior. La diferenciación entre cuencas oceánicas fue confirmada, pero el nivel de diferenciación intraoceánica fue mucho menor al detectado con ADNmt. Esta mayor homogeneidad genética sugirió la existencia de flujo génico entre colonias mediado por machos, dada la fuerte estructuración materna detectada con ADNmt.

Roberts *et al.* (2004) cuestionaron los resultados de homogeneidad intraoceánica obtenida con el ADNncs, atribuyéndola a la baja capacidad que tienen estos marcadores para detectar divergencias recientes debido a su baja tasa de mutación. Los autores analizaron por PCR la variación en cuatro microsatélites nucleares. El interés del estudio fue caracterizar la estructura con ADNn más útil para detectar divergencias recientes, así como comparar dicha estructura con la inferida a partir de ADNncs y de ADNmt. Este trabajo confirmó la existencia de homogeneidad genética entre colonias de la misma cuenca, y por ende señaló a los machos como la vía para el flujo génico principal entre las poblaciones.

Los demás trabajos realizados con la especie abordaron una escala regional, y se basaron en el secuenciamiento de la región de control del ADNmt. Encalada *et al.* (1996) se enfocaron en colonias del Atlántico. Estos autores encontraron que las poblaciones del

Mediterráneo y del Caribe Occidental se distinguieron en conjunto del grupo formado por las colonias del Caribe Oriental, América del Sur y África. Bourjéa *et al.* (2007) analizaron la estructuración en el suroeste del Océano Índico, y detectaron haplotipos característicos del Océano Atlántico, lo cual fue evidencia de que las tortugas verdes son organismos tropicales capaces de cruzar la punta sur de África. Dethmers *et al.* (2006) distinguieron en Australasia 17 unidades de manejo, de las cuales las seis del Pacífico estuvieron fuertemente diferenciadas de las 11 del Índico. Según los autores, dicha discontinuidad genética es el resultado de la restricción del flujo génico por el surgimiento de tierra en el Estrecho de Torres (ubicado entre el noreste de Australia y el sur de Nueva Guinea) en los períodos de glaciación.

2. 4. 2. Caretta caretta

La estructura genética en esta especie ha sido analizada en tres trabajos, en todos ellos ha participado el investigador Brian Bowen. Los dos primeros se caracterizaron por analizar el mismo tipo de marcador, RFLPs de la región de control del ADNmt, pero se distinguen por la escala geográfica del análisis: uno es regional centrado en colonias del sureste de los Estados Unidos y el otro es global. El tercer estudio, más reciente, se centró en la misma región del sureste de los Estados Unidos pero en colonias distintas y se caracterizó por afinar las conclusiones del análisis de ADNmt al secuenciar la región de control así como por complementarlas analizando microsatélites nucleares.

En el primer estudio, Bowen *et al.* (1993) analizaron colonias de Florida, Georgia y Carolina del Sur. Los autores detectaron que la colonia de Florida presentó frecuencias haplotípicas significativamente diferentes de las de Georgia y Carolina del Sur. De esta manera, concluyeron que en Estados Unidos no hay un hábitat continuo para anidar y que tanto Florida como el grupo Georgia/Carolina del Sur forman unidades demográficas distintas.

Frente a la capacidad de distinguir stocks reproductores con ADNmt, el estudio anterior fue ampliado a una escala global (Bowen *et al.*, 1994). Se identificaron haplotipos mayoritarios pero no exclusivos para cada cuenca, por lo que se concluyó que existen dos linajes evolutivos

no relacionados con la separación de las cuencas del Atlántico y del Indo-Pacífico. Para los autores, esto resulta de la distribución en aguas templadas de la especie, lo que le facilita pasar la zona de surgencia frente a las costas de África del Sur. Sin embargo, algunos haplotipos estaban fijos en la mayoría de las colonias, por lo que los autores concluyeron que éstas son fácilmente distinguibles y que por lo tanto las hembras de la especie son fieles al sitio de anidación.

En el estudio más reciente, Bowen *et al.* (2005) afinaron las conclusiones del primer trabajo en la especie al secuenciar un fragmento de la región de control del ADNmt, técnica más sensible para detectar variación genética que el RFLP. Asimismo, los autores complementaron las conclusiones al analizar cinco loci microsatelitales nucleares por PCR. Se detectó una fuerte estructura con ADNmt mientras que con el ADNn no hubo estructura significativa. Así como en tortuga verde, esta diferencia entre los marcadores indicó que las hembras son muy filopátricas, y que el flujo génico entre colonias está mediado por los machos: esta estructura genética fue calificada por los autores como “estructura compleja”.

2. 4. 3. Eretmochelys imbricata

Cuatro estudios se han enfocado al análisis de la estructura genética de la tortuga carey, todos ellos a una escala regional y con base en análisis de la región de control del ADNmt. Dichos trabajos se distinguen por la región oceánica analizada: dos de ellos se realizaron en Australasia, en los que participó el investigador Damien Broderick, mientras que los otros dos se centraron en el Caribe, en los que participaron Ana Bass y Brian Bowen.

Los dos estudios de Australasia se distinguen por las técnicas de análisis. Broderick *et al.* (1994) realizaron un análisis de RFLP en las principales colonias anidadoras de Australia. Las poblaciones del oeste y del noreste australiano presentaron diferencias significativas en las frecuencias de dos haplotipos. Broderick y Moritz (1996) afinaron más el análisis mediante la técnica de secuenciamiento, y ampliaron la cobertura geográfica al incluir colonias de Malasia e Islas Salomón. De 15 haplotipos, 13 fueron exclusivos de colonias específicas, por lo que se

demonstró que las colonias de carey están fuertemente diferenciadas. Asimismo, se confirmó la distinción de las dos poblaciones reproductoras de Australia. Además, dos colonias de Malasia así como la de las Islas Salomón fueron reconocidas como stocks reproductores distintos.

Los dos estudios del Caribe emplearon la técnica de secuenciamiento. Bass *et al.* (1996) se enfocaron en las zonas de anidación, detectando un flujo génico limitado entre colonias y una fuerte filopatria. Bowen *et al.* (2007) analizaron zonas de anidación y de alimentación, y detectaron que en estas últimas se congregan individuos de distintas zonas de anidación. Por ejemplo, en las zonas de alimentación de Cuba se detectaron haplotipos de México, Puerto Rico, Costa Rica y las Islas Vírgenes de los Estados Unidos. Este resultado tiene implicaciones importantes en conservación, pues muestra que si se explotan tortugas en zonas de forrajeo, se está afectando colonias de distintos países.

2. 4. 4. Lepidochelys olivacea

Tres estudios correspondientes a tres grupos de trabajo distintos se enfocaron en la estructura de la tortuga golfina, y todos estuvieron basados en el secuenciamiento de la región de control del ADNmt. Uno de ellos es una evaluación global, mientras que los otros dos son análisis regionales.

Bowen *et al.* (1998) analizaron la filogeografía global de la especie, y detectaron cuatro linajes fuertemente diferenciados: el del sureste de India, el del Océano Índico, el del Atlántico y el del Pacífico del Este.

Shanker *et al.* (2004) analizaron la filogeografía en el sureste de India. Los autores confirmaron que las colonias de esta región forman una población panmíctica, concluyendo que sería la más grande a nivel global, con casi medio millón de tortugas.

López-Castro y Rocha-Olivares (2005) analizaron la estructura genética en las colonias del Pacífico Oriental. Pese a que el primer estudio señaló a las colonias de esta región como una población panmíctica, los autores detectaron una estructuración leve que atribuyeron a la inclusión de colonias de Baja California Sur en sus análisis. Se concluyó que las colonias de Baja

California Sur empiezan a diverger de las demás, lo que concuerda con diferencias etológicas y morfológicas reportadas en las hembras de dicha zona con respecto a las del resto del Pacífico Oriental.

2. 4. 5. *Dermochelys coriacea*

En el caso de la tortuga laúd, su estructura genética ha sido estudiada en distintas escalas geográficas mediante marcadores de tipo mitocondrial y nuclear. Entre los mitocondriales, se ha analizado la secuencia nucleotídica de la región de control y los resultados se encuentran en dos artículos científicos y una memoria de congreso. Entre los marcadores nucleares, se han analizado distintos loci microsatelitales y los resultados aparecen en un reporte técnico, y en una tesis que no había sido defendida al momento de redactar este documento.

Dutton *et al.* (1999) determinaron la filogeografía global de la especie mediante ADNmt. Se detectaron once haplotipos, y se evidenció una fuerte diferenciación interoceánica. Asimismo, se detectó una estructuración significativa pero menos intensa dentro de cada cuenca oceánica. Estos resultados apoyan la teoría de filopatría para la especie. Sin embargo, algunas colonias próximas no fueron distinguibles (e.g. México y Costa Rica en el Pacífico), por lo que se concluyó que el grado de filopatría es menos preciso para la laúd que en otras especies de tortugas marinas. Los autores atribuyeron la falta de diferenciación genética entre dichas colonias al bajo polimorfismo detectado, y a la tasa de mutación de la región de control, la cual no permitiría detectar estructuración reciente. Por ello, recomendaron complementar los resultados de ADNmt con los de ADNn, como los microsatélites nucleares. En este contexto, Dutton (1996b) comparó la resolución proporcionada por la región de control del ADNmt y por microsatélites nucleares, y señaló a éstos como marcadores que pueden ayudar a revelar patrones de flujo génico contemporáneo, que no hayan podido ser detectados con ADNmt.

Dutton *et al.* (2007) analizaron también la región de control, pero se enfocaron en colonias de las Islas Salomón, Papúa Nueva Guinea, e Indonesia en el Pacífico Occidental. No

se detectaron diferencias significativas entre las frecuencias de los seis haplotipos reportados para esta zona, lo que sugirió que estas colonias forman un solo stock genético.

La estructura genética de la especie dentro de la cuenca del Atlántico es discutida en un reporte técnico (Turtle Expert Working Group, 2007). Este documento reconoce siete stocks genéticos con base en datos mitocondriales así como de 14 loci microsatelitales nucleares, la mayoría de estos específicos para la especie. Dichos loci representan una útil herramienta para análisis de estructura genética en la tortuga laúd, sin embargo la secuencia de los iniciadores que se usaron para amplificarlos no fue declarada en el reporte.

En un documento de tesis aún no defendido, Barragán (com. pers.) estudió las playas índice de México mediante dos de los loci microsatelitales nucleares analizados en el Atlántico. El estudio detectó un polimorfismo de 5 y 2 alelos para dichos loci, sin evidencias de una estructura significativa. Sin embargo, la confiabilidad de estos resultados se vería comprometida por el bajo número de loci analizados y por su bajo polimorfismo.

Además de los loci caracterizados con iniciadores específicos para laúd, otros autores han mostrado la posibilidad de amplificar loci microsatelitales nucleares de esta especie, mediante el uso de iniciadores desarrollados para tortugas golfinas (Aggarwal *et al.*, 2004). Dichos autores intentaron amplificar seis de tales loci heterólogos, y tuvieron éxito en cuatro casos. Dos de estos loci mostraron polimorfismo, y el pequeño tamaño de muestra analizado (N=6) sugiere que la proporción de loci polimórficos podría ser mayor. Estos resultados indicaron que la amplificación de dichos loci microsatelitales es posible para la especie, y que por lo tanto podrían ser útiles en un análisis de estructura genética.

2. 5. Justificación

En las últimas décadas el número de anidaciones de laúd en México ha disminuído drásticamente como consecuencia del saqueo de huevos así como de la mortalidad de adultos por pesca. En la actualidad, cerca de la mitad de las anidaciones se concentra en cuatro playas

que abarcan los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Frente a la problemática de la especie en el Pacífico tropical mexicano, y con el fin de caracterizar eficazmente las principales colonias anidadoras de la región, es necesario conocer su estructura poblacional.

La distinción de poblaciones se ha facilitado con análisis de estructura genética, más rápidos, confiables y menos onerosos que el método de marcaje y recaptura. Entre los marcadores moleculares disponibles para analizar la estructura genética de tortugas laúd, los microsatélites nucleares presentan ventajas que incluyen una mayor capacidad para: detectar diferencias en escalas geográficas reducidas y en tiempos evolutivos recientes, evaluar los movimientos de ambos sexos, estimar estadísticos poblacionales como la heterocigosidad y los índices de fijación.

Una investigación basada en la región de control del ADNmt fue incapaz de diferenciar colonias cercanas geográficamente, lo cual puede ser atribuido a la baja resolución que presenta el marcador para distinguir flujo génico reciente. Un estudio no publicado intentó determinar la estructuración de la especie en el Pacífico mexicano mediante el análisis de dos loci microsatelitales nucleares. Sin embargo, su robustez es cuestionable debido al bajo número de loci analizados. Frente a esta situación, existen loci microsatelitales nucleares caracterizados en golfinas que presentan potencial para análisis de estructura en laúd. El grupo de investigación en Genética Molecular de la Universidad del Mar ha venido realizando estudios en tortugas marinas. Este grupo cuenta con la experiencia, infraestructura y materiales necesarios para analizar la estructura genética de la laúd en México, incluyendo los iniciadores desarrollados en golfinas y un lote de muestras de sangre de laúd colectadas en las principales colonias anidadoras.

Por lo anterior, esta tesis pretende realizar un análisis de estructura genética de la tortuga laúd en el Pacífico mexicano, que abarque las principales playas de anidación de este litoral y que esté basado en el empleo de un número considerable de loci microsatelitales nucleares. La realización de este trabajo contribuiría a ampliar los conocimientos sobre las poblaciones de esta especie en el país, y permitiría apoyar con argumentos científicos las estrategias para su conservación.

3. HIPÓTESIS

1. En pruebas preliminares, el uso de iniciadores de PCR específicos para el genoma de tortuga golfinia permitió la amplificación de loci microsatelitales nucleares en laúd. En dichas pruebas se analizaron números reducidos de individuos, lográndose amplificar cuatro loci y detectándose polimorfismo en dos de éstos. Si en esta tesis se analizan números mayores de individuos con los iniciadores mencionados, entonces la similitud entre el genoma de la golfinia y la laúd, así como la naturaleza altamente polimórfica del ADN microsatelital, permitirán amplificar un mayor número de loci y revelar polimorfismos en la mayoría de ellos.

2. Un análisis filogeográfico global de la laúd basado en ADNmt reveló un esquema de diferenciación genética que sugiere la ocurrencia de filopatria en la especie. Sin embargo, no se pudieron diferenciar colonias cercanas como las de México y Costa Rica, lo cual puede atribuirse al bajo polimorfismo detectado y la baja capacidad de este marcador para revelar estructuración reciente. Si la detección fina de estructura genética con ADNmt es limitada, y la especie presenta comportamiento filopátrico moderado, entonces el uso de microsátélites nucleares como sistema de marcadores en el Pacífico mexicano permitirá revelar la existencia de estructura en esta región.

3. La tortuga laúd es una especie considerada como altamente migratoria y en general moderadamente filopátrica. Se ha considerado que el grado de filopatria en la especie es más moderado que el detectado en otras especies de tortugas marinas. Si la laúd es una especie moderadamente filopátrica, entonces el flujo genético que esté ocurriendo entre las colonias anidadoras del Pacífico mexicano deberá reflejarse en un esquema de estructura que muestre una correlación positiva entre la distancia que las separa y su grado de diferenciación.

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo principal

Determinar la estructura genética de la tortuga laúd en el Pacífico tropical mexicano con base en la variación de microsatélites nucleares.

4. 2. Objetivos particulares

1. Generar un banco de extractos de ADN total a partir de muestras de sangre colectadas en las playas índice.
2. Implementar condiciones de amplificación para los loci OR-1, OR-2, OR-4, OR-7 y OR-8.
3. Caracterizar la variabilidad genética de los loci estudiados.
4. Determinar la estructura genética en el área de estudio.