

81.
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**PATRONES DE SUSTITUCION NUCLEOTIDICA
DE LA REGION DE CONTROL DEL DNA
MITOCONDRIAL DE TORTUGAS MARINAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A**

SAMANTHA GABRIELA KARAM MARTINEZ



ESTUDIOS DE TESIS
DIRECTOR DE TESIS:
DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS

1997
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Patrones de sustitución nucleotídica de la región de control del DNA
mitocondrial de tortugas marinas"

realizado por Samantha Gabriela Karam Martínez

con número de cuenta 8955268-1 pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. ALBERTO AFRU GROSIS

Propietario

Biol. Ana Rebeca Barraoán Rocha

Propietario

Biol. Arturo Carlos Il Becerra Bracho

Suplente

Dr. Luis Medrano González

Suplente

M. en C. Leda Carolina Torres Maldonado

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Comisión Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez
DEPARTAMENTO DE BILOGIA
Coordinador de Licenciatura

*A Laura Sarti,
por la invaluable formación.*

*A Luis
y a mi pequeña alegría...*

• Agradecimientos.....	i
• Índice de tablas.....	ii
• Índice de figuras.....	iii
• Lista de abreviaturas.....	iv
• Resumen.....	1
• Introducción.....	2
<i>Las tortugas marinas y los alcances de las técnicas moleculares.</i>	3
<i>El DNA mitocondrial</i>	7
<i>Antecedentes</i>	10
• Objetivos.....	13
• Método.....	14
<i>Secuencias</i>	14
<i>Tasa de sustitución nucleotídica</i>	14
<i>Variación y distribución de la variación</i>	18
<i>Composición nucleotídica</i>	19
<i>Tipos de sustitución nucleotídica</i>	19
<i>Proporción transición/transversión</i>	21
<i>Construcción del árbol de genes</i>	21
• Resultados y Discusión.....	23
<i>Tasa de sustitución nucleotídica</i>	23
<i>Distribución de la variación</i>	30
<i>Composición nucleotídica</i>	34
<i>Tipos de sustitución nucleotídica</i>	38
<i>Árbol de genes</i>	43
• Conclusiones.....	47
• Literatura citada.....	48
• Glosario.....	56
• Anexo 1.....	63
• Anexo 2.....	70

Antes que a nadie quiero agradecer a mi madre, desde la vida hasta la comprensión de mi lejanía, pasando por los maravillosos momentos de 27 años de existencia, los sacrificios, los cuidados y sobre todo, el respeto a lo que soy.

A Luis, por quererme bióloga y por ser mi nuevo alentador en estos menesteres profesionales.

A mi maravillosa familia, la familia Martínez, por todo su incondicional apoyo moral y económico, en especial a mi padre (aunque no sea Martínez), Lucy, Jose, Octavio y Gelis.

A Tavo, por las tardes folklóricas y grises. A Sergio, por los escapes cinematográficos. A Humberto, por las constelaciones del cielo tortuguero. A Patricia, por las grandes carcajadas. A Martha, por las buenas tardes de café en el Centro. A todos, mil gracias por lo que nos quedó de aquellos grandes días, nuestra amistad.

A la Chulita, por ser la hada madrina de mis sueños tortugeros.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Tortugas Marinas, con quienes compartí muchas noches de patrullaje y muchos agradables días, en especial a Ana, Lety, Pancho, Cristo, Libertad, Renata, Miguel, Paty, Ninel y Carlos.

Al Dr. Alberto Abreu, quien dirigió con real paciencia este trabajo y apoyó en todo momento el desarrollo del mismo.

A Luis Medrano, por sus valiosísimas observaciones.

A Ana Rebeca Barragán, por acompañarme en mi "debut" en los quehaceres de la genética molecular.

A Leda y Arturo Becerra, por sus valiosos comentarios.

A Peter Dutton, Sandra Encalada, Ana Bass, Nancy FitzSimmons, Raquel Briseño y Brian Bowen, por haberse mostrado siempre interesados en el desarrollo de mi trabajo y por haberme brindado tantas facilidades para la utilización de sus datos.

A la Fundación UNAM, por el apoyo económico a través de su beca-tesis.

	pág.
I. Taxonomía reciente de las tortugas marinas.....	4
II. Secuencias utilizadas en este trabajo.....	15
III. Matriz para el cálculo de la frecuencia esperada de cada tipo de sustitución.....	20
IV. Estimación de la tasa de sustitución nucleotídica.....	27
V. Comparación de tasas de sustitución por linaje.....	29
VI. Bloques completamente conservados encontrados en la región de control de tortugas marinas.....	33
VII. Composición nucleotídica por género.....	35
VIII. Coeficientes de variación para la composición nucleotídica.....	35
IX. Frecuencias observadas y esperadas para cada tipo de sustitución.....	41
X. Proporciones S/V por género.....	41

	pág.
1. Filogenia y tiempos de divergencia de los diversos linajes de tortugas marinas.....	16
2. Relación entre el tiempo de divergencia y distancia genética en la región de control y en el citocromo b de tortugas marinas.....	26
3. Tasas de sustitución nucleotídica estimadas para la región de control y el citocromo b de tortugas marinas.....	28
4. Distribución de sitios variables en la región de control de tortugas marinas.....	31
5. Índices de diversidad de Shannon-Weaver para la distribución de la variación.....	32
6. Composición nucleotídica de la región de control en los distintos géneros.....	36
7. Coeficientes de variación para la composición nucleotídica.....	37
8. Frecuencias observadas y esperadas de los diferentes tipos de sustitución.....	40
9. Relación entre el tiempo de divergencia y la porción de cambios transicionales en la región de control y en el citocromo b de tortugas marinas.....	42
10. Árbol filogenético generado por el método de Neighbor-Joining, basado en distancias genéticas obtenidas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura entre los 88 haplotipos estudiados.....	46

A.- adenina
C.- citosina
citb.- citocromo b
DNA.- ácido desoxirribonucleico
G.- guanina
Ma.- millones de años
mtDNA.- DNA mitocondrial
NADH.- nicotinamida-adenín-dinucleótido en su forma reducida
ND4-leu.- fragmento del mtDNA comprendido entre los genes que codifican para la NADH subunidad 4 y la leucina
NEP.- nodo evolutivo provisional
PCR.- siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa
RFLP.- siglas en inglés del polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción
RNA.- ácido ribonucleico
S.- transición
T.- timina
V.- transversión

En los últimos años la región de control del DNA mitocondrial ha sido utilizada por varios autores como herramienta para el estudio fino de la estructura poblacional de las diferentes especies de tortugas marinas y para la identificación del origen natal de algunos individuos. Para seguir haciendo un uso adecuado de este marcador molecular, es necesario conocer algunos detalles de su evolución, con el fin de aplicar los modelos que más se apeguen a su dinámica de cambio. Bajo este contexto, en el presente trabajo se analizaron los patrones de sustitución nucleotídica de la región de control mitocondrial de tortugas marinas, utilizando 88 haplotipos diferentes obtenidos de las siete especies existentes.

Se estimó que la región de control mitocondrial de tortugas marinas tiene una tasa de sustitución nucleotídica de 0.17-0.32% sustituciones/sitio/linaje/Ma y no se encontró evidencia de un efecto de saturación de mutaciones como el que se ha reportado para el citocromo b en este grupo de quelonios. La variación en la región de control se distribuye de manera homogénea a lo largo del gen, no se acumula en los extremos 5' y 3' como ha sido reportado en otros vertebrados y presenta tres pequeños bloques totalmente conservados en todas las secuencias analizadas. Por otro lado, no existe una representación homogénea de los cuatro nucleótidos, ya que la adenina y la timina son más frecuentes que la citocina y la guanina. En cuanto a tipos de cambio, las transiciones son más comunes que las transversiones aunque tampoco en éstas se presenta un efecto de saturación aún a niveles de divergencia que abarcan hasta más de 60 millones de años. Dentro de las transiciones, los cambios entre purinas son los más frecuentes.

A través del árbol de genes construido se encontró que existe una marcada separación entre los haplotipos de *Chelonia mydas* del Atlántico y del Pacífico, que no hay evidencia que apoye el nivel de especie de *C. agassizi* y que existe incertidumbre en la ubicación de los géneros *Natator* y *Lepidochelys* en las tribus Carettini o Chelonini.

Los marcadores moleculares se han convertido en herramientas muy útiles para el estudio de la filogenia en diferentes niveles jerárquicos de divergencia evolutiva, desde identidad genética y parentesco, hasta diferenciación entre poblaciones o entre especies, así como historia biogeográfica y filogenética. Dependiendo del nivel jerárquico que se quiere estudiar, se selecciona el marcador molecular más apropiado (Avice, 1994).

Para utilizar adecuadamente los marcadores moleculares es necesario conocer sus patrones evolutivos, ya que estos pueden variar entre grupos taxonómicos, dentro y entre loci (Avice, 1994). Por ejemplo, las diferentes tasas de cambio llegan a estar asociadas a ciertas regiones y no son un fenómeno general del genoma; además, la composición nucleotídica de las secuencias llega a variar significativamente entre diferentes loci (Herbert y Easteal, 1996). Por lo tanto, para estimar la diferenciación genética entre poblaciones y para reconstruir relaciones evolutivas, es necesario elegir los modelos matemáticos que mejor se apeguen a los patrones de sustitución y de composición nucleotídica de las secuencias estudiadas (Rzhetsky y Nei, 1995).

El DNA mitocondrial (mtDNA) posee características evolutivas tan particulares, que ha llegado a ser considerado por varios autores como el marcador molecular más cercano a lo ideal para los análisis filogenéticos (revisado en Rand, 1994). Por ejemplo, mediante el análisis del mtDNA se puede demostrar si la diferenciación genética reflejada en la filogenia matriarcal (ya que en los organismos con reproducción sexual, esta molécula se hereda sólo por vía materna) corresponde con las subdivisiones poblacionales y unidades taxonómicas establecidas por evidencia etológica o morfológica. Este enfoque es particularmente útil en los casos donde el análisis etológico o morfológico es controvertido o no conclusivo, lo cual es común entre las especies de tortugas marinas (Bowen *et al.*, 1991 y 1992).

Dentro del mtDNA existe una porción no codificadora conocida como la "región de control", por dominar la replicación de este genoma y la transcripción de los RNAs que contiene. Este fragmento evoluciona de tres a cinco veces más rápido que el resto del mtDNA, quizás por la falta de limitaciones relacionadas con la codificación (Wenink *et al.*, 1994). Se ha demostrado que el nivel de variación genética de este fragmento es útil para el análisis filogenético intraespecífico (Brown *et al.*, 1993) y varios investigadores lo han escogido como herramienta para el estudio fino de la estructura poblacional de las diferentes especies de tortugas marinas y para la identificación del origen natal de algunos individuos (revisado en Abreu-Grobois *et al.*, 1996).

Hoy en día se cuenta con las secuencias publicadas por diversos autores de la región de control mitocondrial de varias colonias anidadoras de todas las especies de tortugas marinas, sumando más de 85 haplotipos diferentes, los cuales han sido compilados y puestos bajo un mismo formato y alineación con el propósito de facilitar el acceso a esta información en estudios comparativos (Abreu-Grobois *et al.*, 1996).

El presente trabajo utiliza este material con el fin de analizar la dinámica de cambio de este gen del mtDNA en particular, ya que como Hillis y Moritz afirman (en Zhu *et al.*, 1994), "la utilidad de un marcador molecular determinado siempre se ve afectada por su tasa evolutiva y por sus patrones de sustitución nucleotídica".

Las tortugas marinas y los alcances de las técnicas moleculares

Las tortugas marinas aparecieron hace aproximadamente 135 millones de años, evolucionando a partir de las tortugas terrestres. Junto con algunas iguanas y serpientes, son los únicos reptiles adaptados al medio marino que han sobrevivido (Benabib y Cruz, 1981). Los seis géneros y las ocho especies de tortugas marinas actuales pertenecen a dos familias del orden Testudines (Tabla I), uno de los órdenes de reptiles más antiguos cuya historia fósil data de hace 200 millones de años. A lo largo de las eras geológicas, el número de especies de

TABLA I

Orden Testudines.- Todas las tortugas dulceacuicolas, terrestres y marinas.

Familia Dermochelyidae

Especies:

Género *Dermochelys*

D. coriacea (tortuga laúd)

Familia Cheloniidae

Tribu Chelonini

Género *Chelonia*

C. mydas (tortuga verde)

C. agassizii (tortuga prieta)

Género *Natator*

N. depressus (tortuga kikila)

Tribu Carettini

Género *Caretta*

C. caretta (tortuga caguama)

Género *Lepidochelys*

L. olivacea (tortuga golfina)

L. kempi (tortuga lora)

Género *Eretmochelys*

E. imbricata (tortuga carey)

tortugas marinas se ha visto incrementado y disminuido, y la competencia ha dado como resultado la desaparición de algunas especies y la dispersión de otras (Hughes, 1986). Las especies que ahora conocemos se originaron de la primera parte del Eoceno al Pleistoceno, hace 60 a 10 millones de años (Márquez, 1990).

Estos quelonios se encuentran muy bien adaptados al medio marino, poseen un cuerpo hidrodinámico, su caparazón se encuentra reducido y presentan aletas. Como tienen origen en organismos terrestres, respiran por medio de pulmones, sin embargo, cuentan con un sistema de respiración anaerobia en sus tejidos y una distribución preferencial del oxígeno hacia ciertos órganos. Esta adaptación les permite soportar periodos de tiempo muy largos sin salir a la superficie a respirar (Benabib y Cruz, 1981). Por carecer de un sistema de regulación de la temperatura del cuerpo habitan en mares cálidos, a excepción de la tortuga laúd, que por haber desarrollado un sistema de termorregulación por contracorriente similar al de los mamíferos marinos, llega a encontrarse también en aguas templadas (Greer *et al.* 1973). La tortuga laúd es el reptil más ampliamente distribuido, incluso se ha llegado a encontrar en las costas de la Península de Labrador en Alaska (Pritchard, 1980).

Las tortugas verde y Carey tienen una distribución pantropical; la tortuga caguama subtropical; la tortuga golfina también es pantropical pero sin encontrarse al noroeste del Atlántico; la tortuga lora se restringe al Golfo de México y a las costas del este de Estados Unidos; y por último, la tortuga kíkila sólo se encuentra en las costas del norte de Australia (Benabib y Cruz, 1981).

Estas especies pasan la mayor parte del tiempo en mar abierto, en zonas donde se alimentan de medusas, tunicados, pastos marinos, crustáceos y esponjas, dependiendo de los hábitos de cada especie. Cuando las tortugas alcanzan la madurez sexual (entre los 15 y 30 años de edad, o más, según la especie) migran hacia las costas para aparearse y anidar. Algunas de las rutas migratorias usadas por estos organismos han sido estudiadas por medio del método de marcaje-recaptura. En ciertos casos se han calculado distancias recorridas de hasta 5700 km (Benabib y Cruz, 1981).

Generalmente, las tortugas marinas presentan una gran fidelidad a su playa de anidación, este fenómeno se ha tratado de explicar por medio de la hipótesis llamada de la "impronta", que propone que las hembras sexualmente maduras migran para anidar en su playa natal (filopatría) logrando identificarla por la impregnación en su memoria de alguna característica física o química de la misma (Carr, 1967 en Allard *et al.*, 1994). Opuesta a esta hipótesis existe la llamada "facilitación social", que supone que las hembras neófitas aprenden de hembras más experimentadas con las que se encuentran en sus zonas de alimentación, siguiéndolas hasta las playas en donde estas últimas acostumbran anidar, de manera independiente al sitio de nacimiento (Hendrickson, 1958).

Si la hipótesis de la impronta resulta verdadera, entonces cada colonia de hembras anidadoras constituye una población reproductivamente independiente, y por lo tanto, una unidad de manejo potencial. Este hecho ha tratado de ser discernido por medio del marcaje tradicional sin mucho éxito, ya que este método aporta poca información al respecto y sólo a largo plazo por el bajo porcentaje de recaptura que se obtiene (Smith *et al.*, 1978).

La identificación de unidades poblacionales es importante al menos por dos razones, la primera es que estas unidades pueden diferir significativamente en un número de características demográficas de interés para aquellos que manejan el recurso, y la segunda es que algunas de estas poblaciones pueden estar en peligro de extinción y requieren más atención que otras (Smith *et al.*, 1978). En una escala de tiempo evolutivo corta (tal vez unos cuantos miles de años), la dispersión de hembras es suficiente para permitir la colonización de hábitats apropiados próximos a zonas de anidación establecidas. Sin embargo (como lo muestran datos de recaptura de marcas y datos aportados por estudios con mtDNA), el flujo génico mediado por hembras es muy bajo como para tener un impacto significativo en la dinámica poblacional, en una escala de tiempo contemporánea. Es decir, si las hembras de una población se agotan, la dispersión regional no será suficiente para reprovisionar el recurso en una escala de tiempo que es relevante para aquellos que tienen en sus manos el manejo de estas especies (Bowen *et al.*, 1993b; y Avise, 1995).

Además de la evidencia genética actual, los registros históricos indican que la sobreexplotación de poblaciones anidadoras no se compensa a corto plazo por reclutamiento a partir de otras zonas de anidación (Bowen *et al.*, 1992) como aquellas de tortuga verde en Gran Caimán, Bermuda y Alto Velo que se extrajeron en los últimos cuatro siglos (Parsons, 1962 en Bowen *et al.*, 1992) y como las colonias de arribazón de tortuga golfina en el Playón de Mismaloya y Piedra de Tlacoyunque (Márquez *et al.*, 1982) que no han sido recolonizadas por reclutamiento natural.

Por otro lado, poco se sabe del impacto que ha tenido la provocada disminución de los números poblacionales de las colonias anidadoras sobre la composición genética de las especies. Dicha disminución puede causar la pérdida de variabilidad genética por deriva génica, disminuyendo la adaptabilidad a un medio en constante cambio además del consecuente incremento en homocigosidad de mutantes recesivos parcialmente deletéreos que en poblaciones grandes son poco frecuentes (Lande, 1988).

Este panorama resalta el gran alcance que tiene el uso de marcadores moleculares en el estudio de las poblaciones de las especies de tortugas marinas, ya que el conocimiento de las mismas, siempre traerá mejoras en los planes de manejo y conservación de este recurso.

El DNA mitocondrial

Los marcadores moleculares son cada vez más utilizados para estimar parámetros genéticos de relevancia en la biología de la conservación, tales como flujo génico, estructura poblacional, heterocigosidad, así como para realizar la caracterización genética de unidades demográficas básicas y las discontinuidades taxonómicas (Avice, 1995).

Si uno quisiera especificar las propiedades deseadas para un sistema molecular ideal para estos fines, incluiríamos lo siguiente:

- a) que sea distintivo y ampliamente distribuido, de tal manera que puedan realizarse comparaciones homólogas seguras entre una amplia variedad de organismos;
- b) que sea fácil de aislar y procesar;
- c) que posea una estructura genética simple, sin características complicadas como DNA repetitivo, elementos móviles, pseudogenes o intrones;
- d) que tenga un modo simple de transmisión genética, sin recombinación u otros arreglos genéticos;
- e) que evolucione rápidamente.

En un grado significativo, el mtDNA de los vertebrados concuerda con todos los criterios mencionados (Avise *et al.*, 1987 y 1995). Es una molécula circular, formada por aproximadamente 16 mil pares de bases, codifica para cinco proteínas conocidas, seis marcos de lectura no identificados (Nei, 1987), 13 RNAs mensajeros, dos RNAs ribosomales y 22 RNAs de transferencia (Avise *et al.*, 1987). Además de estos genes, posee el área conocida en vertebrados y equinodermos como "región de control", y conocida como la zona "rica en A+T" en *Drosophila*, la cual tiene alrededor de 0.8 kilobases de largo y parece ejercer control sobre la replicación del mtDNA (que inicia en esta región) y la transcripción de los RNAs (Avise *et al.*, 1987).

En cuanto a propiedades evolutivas, el mtDNA:

- a) no presenta intrones, ni secuencias repetitivas, ni pseudogenes o secuencias espaciadoras entre genes (Avise *et al.*, 1987), en general posee relativamente poca variación debido a deleciones o inserciones (Aquadro y Greenberg, 1983; y Hoelzel *et al.*, 1991);
- b) se encuentra libre de recombinación ya que sólo es heredado por vía materna, por lo tanto, a diferencia del DNA nuclear, las mutaciones que surgen en diferentes individuos no son recombinadas durante la reproducción sexual (Avise *et al.*, 1987);
- c) evoluciona en promedio diez veces más rápidamente que el DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979). Esta velocidad de cambio puede ser provocada por 1) una alta tasa de mutación debido a que el mecanismo de corrección del

complejo de replicación es ineficiente o está ausente; o *ii*) existe una alta tasa de fijación debido a la baja limitación funcional en los productos del mtDNA (citocromos, ubiquinonas, RNAs mensajeros, ribosomales o de transferencia) ya que en la célula, por cada genoma nuclear hay varios genomas mitocondriales, consecuentemente, cualquier otro cambio en estos múltiples genomas no afecta significativamente la función celular (Li y Graur, 1991).

Por otro lado, conforme el mtDNA ha sido utilizado como marcador molecular para estudios en diferentes grupos, se ha observado que presenta particularidades en sus patrones evolutivos, los cuales han tenido que ser incorporados en los modelos de estimación de distancias genéticas para hacerlos más útiles y reales (Tamura y Nei, 1993; y Zhu *et al.*, 1994). Entre estos patrones encontramos:

- a) una composición nucleotídica no uniforme;
- b) un mayor número de transiciones que de transversiones (Aquadro y Greenberg, 1983; Hedges *et al.*, 1991; Bowen *et al.*, 1993a; Brown *et al.*, 1993; Tamura y Nei, 1993; Wenink *et al.*, 1994; y Zhu *et al.*, 1994);
- c) una mayor frecuencia de transiciones entre pirimidinas que entre purinas (Tamura y Nei, 1993);
- d) diferentes tasas de sustitución dentro de un mismo gen. en particular se ha observado que los extremos 5' y 3' de la región de control son más variables que la zona media del fragmento (Hoelzel *et al.*, 1991; Dillon y Wright, 1993; Tamura y Nei, 1993; y Wenink *et al.*, 1994).

Enfocarse en las particularidades evolutivas del mtDNA puede ayudar a comprender mejor la historia natural de esta molécula y de los organismos que la portan (Rand, 1994).

Antecedentes

La historia del uso de técnicas moleculares en estudios sobre tortugas marinas data de 1978, cuando Smith y colaboradores utilizaron proteínas electroforéticas de las tortugas verde y caguama, descubriendo que éstas tienen baja diversidad genética: de 13 proteínas, sólo una resultó polimórfica. En 1982, Frair en un trabajo con electroforesis de suero sanguíneo, encontró que en varias especies de tortugas marinas existe cierta variabilidad intraespecífica.

Durante varios años no hubo publicaciones sobre evolución molecular y filogenia en tortugas marinas. Fue hasta los noventa que gracias al desarrollo de técnicas moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), surgió una nueva serie de estudios moleculares.

En 1991, Bowen y colaboradores utilizando el análisis del polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) del mtDNA, demostraron que la tortuga lora es distinta de la golfina en filogenia matriarcal y que las dos son especies hermanas con respecto al resto de las tortugas marinas. La separación de estas dos especies data de la formación del Istmo de Panamá, mientras que la dispersión global de la tortuga golfina ocurrió recientemente. Este estudio corroboró la taxonomía de la tortuga lora, que es la especie de tortuga marina que se encuentra en mayor peligro de extinción, y proporcionó fundamentos científicos que justifican el intensificar el cuidado de la única población importante a nivel mundial que queda de esta especie, en Tamaulipas.

En 1992, Avise y colaboradores encontraron en un estudio con RFLPs en Testudines, que el mtDNA de las tortugas tiene una tasa evolutiva varias veces menor (0.25% Ma) que la convencional para otros vertebrados (2% Ma). Es decir, en las tortugas se acumulan diferencias en un 0.25% de los sitios por cada millón de años que dos linajes permanecen separados. Esta baja tasa de evolución también ha sido encontrada en otros organismos que coinciden con las tortugas en ser ectotérmicos, en poseer una lenta tasa metabólica y en tener un largo tiempo generacional (Martin y Palumbi, 1993).

Bowen y colaboradores (1992) investigaron la estructura poblacional global y la historia natural de la tortuga verde utilizando RFLPs de mtDNA, encontrando también un bajo nivel de variabilidad y una lenta tasa evolutiva en relación con otros vertebrados. Por otro lado, demostraron una división filogenética entre las tortugas verdes del Atlántico-Mediterráneo y las de los Océanos Índico y Pacífico. No obtuvieron ninguna evidencia de una diferenciación genética de la forma taxonómica del Pacífico Oriental, considerada por algunas autoridades como subespecie (*Chelonia mydas agassizi*) o como especie (*C. agassizi*), pero sí de una subestructura poblacional geográfica asociada con cada cuenca oceánica. De manera paralela, Karl y colaboradores en el mismo año desarrollaron RFLPs de loci nucleares anónimos en tortugas de la misma especie. Este estudio reveló que existen tasas moderadas de flujo génico mediado por machos a pesar de la fuerte estructura genética sugerida por los linajes matrilineales.

Bowen y colaboradores (1993b) realizaron un estudio con RFLPs de mtDNA con el fin de analizar la estructura de las poblaciones del Atlántico Nororiental y Mar Mediterráneo de la tortuga caguama. Los resultados sugirieron que existe limitación en el flujo génico contemporáneo entre poblaciones regionales, por lo tanto, las hembras tienden a anidar en sus playas natales y las poblaciones anidadoras estudiadas deberían ser manejadas como unidades taxonómicas independientes.

En 1994, Allard y colaboradores mediante la secuenciación directa de la región de control de la tortuga verde, lograron obtener importante evidencia que también apoya la fidelidad de las hembras anidadoras a su playa de nacimiento. En el mismo año, Norman y colaboradores desarrollaron una serie de primers específicos para la amplificación de la región de control en tortugas de la familia Cheloniidae y las probaron en poblaciones Indo-Pacíficas de la tortuga verde, encontrando que la región de control evoluciona ocho veces más rápido que la tasa promedio de todo el mtDNA, y que la tortuga verde de esta zona presenta varias poblaciones diferenciadas con un mínimo flujo génico de hembras, por lo menos.

En 1993(a), Bowen y colaboradores realizaron una filogenia molecular para tortugas marinas mediante la secuenciación directa del citocromo b (gen del mtDNA), con el fin de resolver controversias antiguas acerca de la filogenia del grupo y estimar tasas evolutivas. Encontraron que la tortuga kikila no está tan cercanamente relacionada con las Chelonias como se pensaba, que existe una parafilía entre la tortuga verde y la prieta, y que las tortugas golfina y lora son genéticamente diferentes. Esta misma evidencia se usó para proponer que la tortuga carey tiene ancestros carnívoros y no herbívoros como lo había sugerido el mapeo filogenético de hábitos alimentarios (Bowen *et al.* 1993a). Con fines similares, Dutton y colaboradores (1996) secuenciaron la región comprendida entre los genes que codifican para la NADH subunidad 4 y la leucina, además de la región de control de las ocho especies de tortuga marina, encontrando que al unir los datos de ambos fragmentos con los publicados por Bowen y colaboradores (1993a), se corrobora la filogenia producida sólo por los datos de citocromo b.

FitzSimmons y colaboradores (1995) analizaron varios loci de microsatélites nucleares, encontrando que la baja tasa de sustitución en el mtDNA de tortugas es similar a la de genes nucleares y que la variación de los microsatélites es también consistente con los resultados de los estudios previos con mtDNA.

En 1995, Bowen y colaboradores, mediante la secuenciación de la región de control del mtDNA 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 y colaboradores, utilizando la misma técnica buscaron el origen de las tortugas carey que se alimentan en el Caribe (en su mayoría juveniles). Los resultados mostraron que en estas áreas existe una mezcla de organismos con origen en diferentes playas de anidación.

General

Analizar los patrones de sustitución nucleotídica de la región de control del mtDNA de tortugas marinas.

Particulares

1. Estimar la tasa de sustitución nucleotídica.
 2. Analizar la distribución de la variación.
 3. Analizar la composición nucleotídica.
 4. Analizar la frecuencia de los diferentes tipos de sustitución.
- Construir un árbol filogenético para el grupo (árbol de genes) basado en 88 secuencias de la región de control mitocondrial.

Secuencias

Para llevar al cabo el presente trabajo, se utilizaron las secuencias producidas por diversos autores mediante el uso de procedimientos y de primers diferentes, las cuales se muestran en los Anexos 1 y 2. Estas fueron compiladas y alineadas por Abreu-Grobois y colaboradores (1996). Las secuencias suman un total de 88 haplotipos diferentes pertenecientes a las ocho especies actuales de las familias Dermochelyidae y Cheloniidae. En la Tabla II se especifican las secuencias usadas así como las citas a las fuentes. La designación de cada secuencia es la utilizada por Abreu-Grobois y colaboradores (1996), en la cual las dos primeras letras corresponden a las iniciales del género y la especie, separadas por un guión de la clave asignada para cada haplotipo por el propio autor de la secuencia, cuyo apellido aparece separado por una diagonal.

El origen de cada haplotipo puede ser consultado en fuentes originales.

Tasa de sustitución nucleotídica

La tasa de sustitución nucleotídica de un gen es una medida de la velocidad con que se acumula variación en las secuencias a lo largo del tiempo. Para conocerla es necesario estimar el número de diferencias nucleotídicas presentes entre dos secuencias (es decir, la distancia genética) y relacionarlo con el tiempo de divergencia entre los linajes.

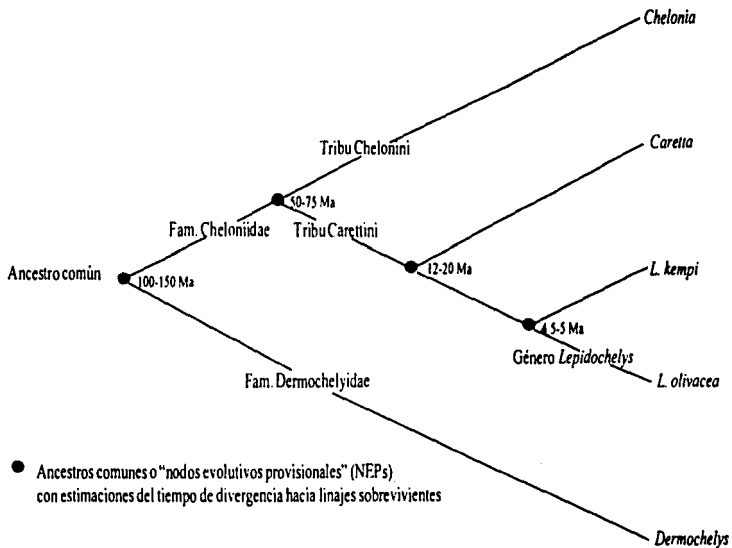
Para estimar la tasa de sustitución nucleotídica de la región de control mitocondrial de tortugas marinas, se relacionaron las distancias genéticas con los tiempos de divergencia de los linajes bajo comparación. Los tiempos se derivaron de evidencia fósil (Figura 1, adaptado de Bowen *et al.*, 1993a):

TABLA II

Secuencias utilizadas en este trabajo.

CC/L35254 y CC/L35255	2	L35254 y L35255	Laurent <i>et al.</i> , 1995 (sin publicar)	Atlántico-Mediterráneo
CC-A/Bowen a CC-C/Bowen	3	CC-A: U22261	Bowen <i>et al.</i> , 1995	Australia
CM-I/Encalada a CM-I&Encalada	18	Z501224-Z50140	Lahanas <i>et al.</i> , 1994 Encalada, 1995 Encalada <i>et al.</i> , en prensa	Atlántico-Mediterráneo
CM-NGBR/Norman a CM-SWK/Norman	15	(no está en el Gene Bank)	Norman <i>et al.</i> , 1994	Indo-Pacífico
CM-TAT/Allard a CM-CGC/Allard	4	CM-TAT: M98394	Allard <i>et al.</i> , 1994	Atlántico
EI-A/Bass a EI-gamma/Bass	24	EI-A, -F, -N, -Q y -R: U22368 y U37804-U37807	Bass <i>et al.</i> , 1996	Atlántico y Caribe
DC-A/Dutton a DC-II/Dutton	8	(no está en el Gene Bank)	Dutton <i>et al.</i> , 1995	Caribe, Atlántico, Pacífico, Indo-Pacífico
CC/Dutton a DC/Dutton	10	CC: U40435 CM-PA: U40436 LK: U40657 EI: 040658 CA: 040659 CM-AT: U40660 LO: U40661 ND: U40662 DC: U40663	Dutton <i>et al.</i> , 1996	Atlántico, Pacífico, Caribe
ND-A/FitzSimmons y ND-C/FitzSimmons	2	(no está en el Gene Bank)	FitzSimmons <i>et al.</i> , sin publicar	Australia
LO-K/Briseño	1	(no está en el Gene Bank)	Briseño (sin publicar)	Pacífico
LK-LK3B/Bowen	1	(no está en el Gene Bank)	Bowen (sin publicar)	Golfo de México, Atlántico

FIGURA I
 Filogenia y tiempos de divergencia en los diversos linajes de las tortugas marinas.



- Ancestros comunes o "nodos evolutivos provisionales" (NEPs) con estimaciones del tiempo de divergencia hacia linajes sobrevivientes

- la familia Dermochelyidae y la protoCheloniidae se separaron hace 100 a 150 millones de años (Ma);
- la subfamilia Carettini y la Chelonini hace 50 a 75 Ma;
- el género *Caretta* y el género *Lepidochelys* hace 12 a 20 Ma; y
- las especies *L. olivacea* y *L. kempfi* hace 4.5 a 5 Ma

Se estimaron distancias genéticas entre todas las secuencias disponibles de cada par de linajes y se obtuvo el valor promedio. El cómputo de las distancias se realizó a través del programa para computadora MEGA (Kumar *et al.* 1993), por medio del modelo de los dos parámetros de Kimura (1980) que toma en cuenta que existen diferencias en la frecuencia de cambios transicionales y transversionales en el mtDNA de vertebrados, a través de la siguiente ecuación:

$$D = \frac{1}{2} \log_e (1 - P - Q) - \frac{1}{4} \log_e (1 - 2Q)$$

$$P = N_s/N$$

$$Q = N_v/N$$

En donde D es la distancia genética, P es la proporción de diferencias transicionales, Q la proporción de diferencias transversionales, N_s el número de diferencias transicionales entre dos secuencias, N_v el número de diferencias transversionales y N el número total de sitios comparados.

Una vez estimadas las distancias, se elaboró una gráfica de tiempo de divergencia contra distancia genética y se procedió a calcular la pendiente de cada punto con respecto al origen. Esto permite derivar la tasa de sustitución por medio de la siguiente ecuación, que toma en cuenta que a partir del tiempo de divergencia, cada rama acumula variación de manera independiente:

$$S = D/(2T)$$

En donde S es la tasa de sustitución por par de linajes, D es la distancia promedio entre las secuencias y T es el tiempo de divergencia entre el par de linajes bajo consideración a partir de un ancestro común ("nodo evolutivo provisional"- NEP). Se utiliza una escala de tiempo en millones de años.

Para el presente estudio se estimó la tasa global de sustitución por linaje, de dos maneras:

- 1) la media de las tasas que fueron calculadas de manera independiente para cada par de linajes (Tabla IV);
- 2) la pendiente de la porción de la curva entre el origen y el punto correspondiente a la separación entre *L. olivacea* y *L. kempi*, siguiendo el procedimiento usado por Bowen y colaboradores (1993a) (en negritas en la Tabla IV).

Variación y distribución de la variación

A través del programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993) se realizaron comparaciones pareadas entre todas las secuencias y se computó el número de sitios variables e informativos, sin tomar en cuenta a los "gaps" (ver Glosario). A partir de estos datos, se determinó el número de sitios variables por cada cinco sitios y se construyó un histograma con el fin de analizar la distribución de la variación a lo largo del gen.

Ya que las secuencias utilizadas se generaron bajo condiciones distintas (primers y algunos procedimientos distintos) se encontró una ligera variación en la longitud y en la porción de la región de control que representan. Para verificar que la distribución de la variación en la región de control no fuera influenciada por este hecho, se incluyó el cálculo del índice de diversidad de Shannon-Weaver para cada sitio. Este índice es ampliamente utilizado en ecología cuando se trata de describir comunidades, ya que toma en cuenta la presencia de variación en el número de los distintos elementos presentes en cada sitio muestreado y su abundancia relativa (Begon *et al.*, 1990). Los cálculos se realizaron mediante la siguiente ecuación:

$$H = -\sum_{i=1}^S (p_i)(\log_2 p_i) \quad (\text{tomada de Krebs, 1994})$$

En donde H es el índice de diversidad por sitio (en este caso el índice de diversidad nucleotídica), S es el número de elementos (los diferentes tipos de nucleótidos, es decir, cuatro) y p_i es la frecuencia de la *i*-ésima base en cada sitio.

Se calculó un índice por cada sitio y se obtuvo un promedio de los mismos por cada cinco sitios, con los cuales se construyó una gráfica.

Composición nucleotídica

Mediante el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993) se obtuvo la frecuencia relativa de cada uno de los cuatro nucleótidos (composición nucleotídica) en cada secuencia analizada. A partir de estos datos se calcularon medias y coeficientes de variación para cada género y para el conjunto global de secuencias.

Se aplicaron pruebas de ji cuadrada para la composición nucleotídica de cada secuencia. En dichas pruebas, la composición observada se comparó con la composición esperada de 25% para cada uno de los nucleótidos si la composición fuera homogénea. Las pruebas se realizaron bajo la hipótesis nula de que entre los valores observados y los esperados no existen diferencias significativas.

Tipos de sustitución nucleotídica

Se realizaron comparaciones pareadas entre todas las secuencias y se computó el número de transiciones, transversiones y bases idénticas mediante el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993). A partir de estos datos se obtuvieron las proporciones observadas de cada tipo de sustitución. Las proporciones esperadas se obtuvieron calculando la probabilidad de cambio dada la frecuencia observada de cada tipo de base (ver matriz de la Tabla III). Es importante aclarar que los cambios transicionales y transversionales se multiplicaron por dos, ya que estos se pueden dar en un sentido o en otro (por ejemplo de A hacia T o de T hacia A).

Se aplicó una prueba de ji cuadrada bajo la hipótesis nula de que las proporciones de cada tipo de sustitución observadas y esperadas, no son significativamente diferentes.

TABLA III

Matriz para el cálculo de la frecuencia esperada de cada tipo de sustitución.

A	$(f_{obs} A)(f_{obs} A)$	$2(f_{obs} A)(f_{obs} T)$	$2(f_{obs} A)(f_{obs} C)$	$2(f_{obs} A)(f_{obs} G)$
T		$(f_{obs} T)(f_{obs} T)$	$2(f_{obs} T)(f_{obs} C)$	$2(f_{obs} T)(f_{obs} G)$
C			$(f_{obs} C)(f_{obs} C)$	$2(f_{obs} C)(f_{obs} G)$
G				$(f_{obs} G)(f_{obs} G)$

f_{obs} = frecuencia observada

Proporción S/V

La llamada proporción S/V es el cociente del número de transiciones y el número de transversiones encontradas al comparar entre pares de secuencias homólogas. Este parámetro nos indica si las transiciones ocurren tan comúnmente como las transversiones en un fragmento ($S/V=1$) o si uno de estos dos tipos de sustitución ocurre con mayor frecuencia ($S/V > 1$, cuando el número de transiciones es superior, o $S/V < 1$ cuando lo es el número de transversiones) (Kumar *et al.*, 1993).

Se calcularon las proporciones S/V para el conjunto de secuencias por medio del modelo de dos parámetros de Kimura (1980) usando el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993), el cual estima el número de sustituciones nucleotídicas transicionales (S) y transversionales (V) por sitio para cada par de secuencias a través de la siguiente ecuación:

$$S/V = \log_e (1 - 2P - Q) / \log_e (1 - 2Q) - 1/2$$

El conjunto de datos obtenido se resumió en medias e intervalos para cada género y para el conjunto global de secuencias.

Construcción del árbol de genes

La reconstrucción de árboles filogenéticos es un proceso estadístico que genera una estimación gráfica de las verdaderas relaciones evolutivas. Es muy difícil conocer el árbol de especies verdadero para cualquier grupo de organismos, sin embargo, es posible inferirlo examinando las relaciones evolutivas de genes de los organismos en consideración (Kumar *et al.*, 1993).

De los numerosos métodos que existen para construir árboles filogenéticos a partir de datos moleculares, se utilizó un método de distancia conocido como Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987 en Kumar *et al.*, 1993) a través del programa para computadora MEGA (Kumar *et al.*, 1993). Recientemente se ha probado por medio de simulaciones por computadora que este método es uno de los más eficaces en la obtención de una topología correcta, y que incluso llega a

ser superior a los métodos de caracteres discretos o de máxima parsimonia (Nei, 1991 en Kumar *et al.*, 1993).

El método Neighbor-Joining es una versión simplificada del método de Mínima Evolución (Saitou e Imanishi, 1989; y Rzhetsky y Nei, 1992 en Kumar *et al.*, 1993), en el cual se utilizan medidas de distancia que corrigen para cambios múltiples en el mismo lugar, en este caso las generadas a través del modelo de dos parámetros de Kimura. Se selecciona como el árbol correcto, aquel cuya topología muestra el menor valor de la suma (S) de todas las ramas (existirán $2m-3$ ramas en un árbol con m OTUs).

Rzhetsky y Nei (1993 en Kumar *et al.*, 1993) han demostrado que cuando se utilizan estimaciones de distancias evolutivas no sesgadas (por ejemplo, las producidas a través del modelo de 2 parámetros de Kimura), la topología siempre da el valor esperado más pequeño de S. Por lo anterior, el método de Mínima Evolución tiene un sólido fundamento teórico.

En el caso del método Neighbor-Joining se examinan diferentes topologías y se produce un solo árbol final en lugar de computar un valor S para todas las topologías. Este método produce árboles sin raíz a menos que se utilice un grupo externo para encontrarla; sin embargo, el programa MEGA en ausencia de un grupo externo (como en este caso), coloca la raíz en el punto medio de la ruta de conexión más larga entre dos OTUs del árbol.

Con el fin de comprobar la confiabilidad del árbol obtenido, se realizó un análisis conocido como "bootstrap" o remuestreo analítico a través del programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993). En esta prueba se remuestran por simulaciones de computadora los nucleótidos usados para el árbol, con remplazo, a partir de las secuencias en el conjunto de datos originales. Este remuestreo se repite cientos de veces (en este caso 500 veces) y se determina el número de ocasiones (en porcentaje) que cada uno de los brazos del árbol reconstruido se repite en la misma posición en las simulaciones. Entre más confiable (robusto) sea el brazo del árbol, el valor estará más cercano al 100%, este valor es conocido como nivel de confianza según el remuestreo.

Tasa de sustitución nucleotídica

Según la teoría del reloj molecular, la tasa de cambio de un gen debería ser constante entre los diferentes miembros de un linaje (Li y Graur, 1991). De ser así, al graficar tiempo de divergencia contra distancia genética, se obtendría una línea recta con una pendiente única. Sin embargo, se ha demostrado en estudios con diversos organismos, que la tasa de sustitución no es constante entre los miembros de un linaje y que ésta disminuye considerablemente conforme se comparan grupos más divergentes (>15-20 Ma), provocando que las curvas de tiempo de divergencia contra distancia genética tiendan hacia una asíntota (Avise, 1994; y Bowen *et al.*, 1993a). Se ha sugerido que este comportamiento refleja un efecto de "saturación" que se debe a *i)* la existencia de un número limitado de sitios variables en el locus y *ii)* estos sitios eventualmente se saturan con una proporción máxima de mutaciones (Avise, 1994). En la Figura 2 se observa que la región de control de las tortugas marinas no presenta tendencia hacia una asíntota, como en el citocromo b del mismo grupo (ver Bowen *et al.*, 1993a), a pesar de que la tasa de sustitución sí disminuye conforme aumenta la divergencia entre los grupos.

El valor de la tasa de sustitución de la región de control varía según el procedimiento de estimación utilizado (Tabla IV):

- a) Existe una diferencia de un orden de magnitud entre la tasa de sustitución calculada para el par de linajes más divergente (nodo entre familias Dermochelyidae y Cheloniidae) y aquella para el par de linajes más reciente (nodo entre *L. olivacea* y *L. kempi*). Por lo anterior, resultó conveniente obtener *i)* la media de las tasas sin tomar en cuenta al par de linajes más reciente, 0.17% sustituciones/sitio/linaje/Ma; y *ii)* la media de las tasas tomando en cuenta al par de linajes más reciente, 0.32% sustituciones/sitio/linaje/Ma. La desventaja de esta estimación es que no

nos permite observar la velocidad de cambio del gen en taxa originados recientemente.

- b) Siguiendo el método de Bowen y colaboradores (1993a), la tasa de sustitución estimada a partir de la porción de la curva entre el origen y la separación entre *L. olivacea* y *L. kempfi* (que en otros casos resulta ser la porción más lineal de la curva), fue de 0.76% sustituciones/sitio/linaje/Ma, con negritas en la Tabla IV (Figura 2). Esta estimación tiene la desventaja de no ser representativa del grupo en general, sin embargo, resulta útil para fines de comparación con tasas de tortugas marinas anteriormente calculadas mediante este mismo procedimiento.

Como podría esperarse bajo el concepto de limitación funcional (Li y Graur, 1991), la región de control presenta una tasa de sustitución hasta cuatro veces mayor a la reportada para el citocromo b (Bowen *et al.*, 1993a) (Figura 3). Este resultado concuerda con otros estudios que han indicado que en la región de control se tiene una tasa de sustitución de dos a 15 veces más elevada que en el genoma completo (Brown *et al.*, 1979; Aquadro y Greenberg, 1983; Cann *et al.*, 1984; Vigilant *et al.*, 1991; Quinn, 1992; y Bernatchez y Danzmann, 1993).

Una mayor tasa de sustitución en la región de control se explica por el hecho de que, a diferencia del citocromo b, esta zona no codifica para proteínas y por lo tanto, no posee las restricciones evolutivas propias de este tipo de loci. Presumiblemente, sólo posee sitios de iniciación para la replicación y la transcripción (Kreitman, 1983). Aún así, la tasa de sustitución de la región de control mitocondrial de tortugas marinas resulta mucho menor que la de otros vertebrados (Tabla V), en algunos casos en un orden de magnitud y en el caso de los humanos en dos, lo cual coincide con la baja tasa evolutiva reportada en Testudines por Avise y colaboradores (1992). La tasa de sustitución de la región de control de la tortuga verde estimada por Lahanas y colaboradores (1994), 0.88% sustituciones/sitio/linaje/Ma, tiene un valor muy cercano al calculado en el presente trabajo según el método de Bowen y colaboradores (1993a), 0.76% sustituciones/sitio/linaje/Ma. La semejanza puede deberse a que ambas tasas se

estimaron a partir de datos generados por grupos que divergieron muy recientemente: las tortugas verdes del Atlántico y del Pacífico en el primer caso y las especies *L. olivacea* y *L. kempi* en el segundo, ambos eventos de separación datan de la formación del Istmo de Panamá (Bowen *et al.*, 1992 y 1993a).

Esta baja tasa evolutiva ha sido observada en genes nucleares y mitocondriales de otros vertebrados que coinciden con las tortugas marinas en ser ectotérmicos, en poseer un largo tiempo generacional, en tener una baja tasa metabólica y en tener un tamaño corporal relativamente grande (revisado en Rand, 1994).

Los organismos ectotérmicos poseen menor tasa de mutación que los endotérmicos, ya que tienen una tasa metabólica más lenta y, por lo tanto, consumen menos oxígeno, de tal manera se infiere que su DNA presenta menos daño causado por radicales oxígeno (Richter *et al.*, 1988 en Avise *et al.*, 1992). Asimismo, el tiempo generacional puede tener influencia en la baja tasa de mutación de acuerdo a la hipótesis que dice que las especies con tiempos generacionales largos poseen un menor número de replicaciones de DNA por unidad de tiempo, lo cual disminuye la probabilidad de mutación. Existe una estrecha relación entre el tiempo generacional y el tamaño corporal, a mayor tamaño corporal, mayor tiempo generacional. Por otro lado, se ha observado que el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna consume una buena parte del oxígeno disponible para los animales, lo cual constituye un componente importante de la tasa metabólica. Estudios recientes han demostrado que en animales con mayor masa corporal existe una menor tasa de transporte de protones y por lo tanto, su tasa metabólica es menor (Rand, 1994).

FIGURA 2
Relación entre tiempo de divergencia y distancia genética
en la región de control y en el citocromo b de tortugas marinas.

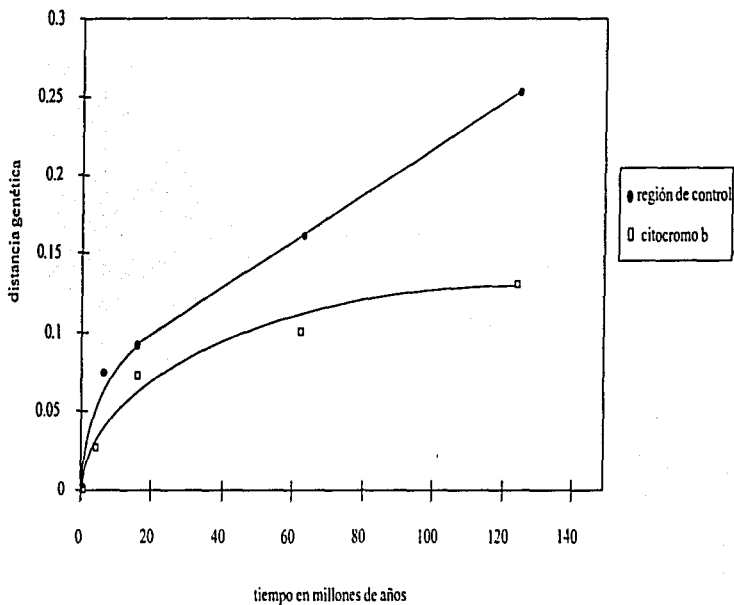


TABLA IV

Estimación de la tasa de sustitución nucleotídica.

Familias Dermochelyidae y Cheloniidae	100	150	125	0.248	0.096
Subfamilias Caretini y Chelonini	50	75	62.5	0.1626	0.130
Géneros <i>Caretta</i> y <i>Lepidochelys</i>	12	20	16	0.0908	0.284 / media= 0.17
<i>L. olivacea</i> y <i>L. Kempi</i>	4.5	5	4.8	0.0738	0.769 / media= 0.32

* nota: los valores de tasa de sustitución son frecuentemente expresados por pares de linajes, es decir, dos veces los valores aquí presentados

FIGURA 3
 Tasas de sustitución nucleotídica estimadas para la región de control y
 el citocromo b de tortugas marinas (datos del citb, tomados de Bowen *et al.*, 1993a).

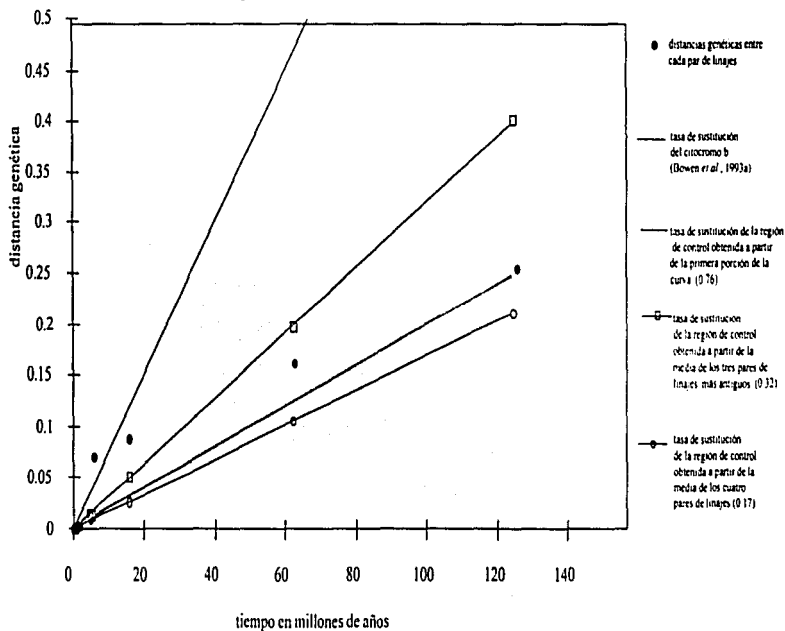


TABLA V
 Comparación de tasas de sustitución por linaje.

región de control	tortugas marinas	0.17 - 0.32 y 0.76	presente trabajo
región de control	tortuga verde	0.88	Lahanas <i>et al.</i> , 1994
citocromo b	tortugas marinas	0.1 - 0.2	Bowen <i>et al.</i> , 1993a
mtDNA completo (analizado mediante RFLPs)	tortugas en general	0.25	Avise <i>et al.</i> , 1992
mtDNA completo (analizado mediante RFLPs)	mamíferos	1	Brown <i>et al.</i> , 1979
región de control	cetáceos	0.5	Hoelzel <i>et al.</i> , 1991
región de control	roedores	0.5 - 1.0	Brown <i>et al.</i> , 1986
región de control	primates	0.5 - 1.0	Foran <i>et al.</i> , 1988 en Hoelzel <i>et al.</i> , 1991
región de control	humano	11.5 - 17.5	Vigilant <i>et al.</i> , 1991 en Brown <i>et al.</i> , 1993

* nota: los valores de tasa de sustitución son frecuentemente expresados por pareras de linajes, es decir, dos veces los valores aquí presentados.

Distribución de la variación

Se analizaron un total de 661 sitios, de los cuales 250 resultaron polimórficos y 212 informativos.

En la literatura ha sido reportado que en cetáceos (Hoelzel *et al.*, 1991; y Dillon y Wright, 1993), en primates (Tamura y Nei, 1993) y en aves costeras (Wenink *et al.*, 1994), los extremos 5' y 3' de la región de control son más variables que la zona media del fragmento. En la Figura 4 se observa que la región de control en las tortugas marinas no sigue este mismo patrón de distribución de la variación, ya que ésta se distribuye de manera más o menos homogénea a lo largo de toda la porción del gen estudiada. Sin embargo, se observan tres pequeños bloques que se muestran completamente conservados en la totalidad de las secuencias (Tabla VI). Estos bloques pueden corresponder a sitios de unión de proteínas (Lee *et al.*, 1995), a las zonas de inicio de la replicación de este genoma o de la transcripción de algunos genes (Saccone *et al.*, 1991 en Wenink *et al.*, 1994); incluso se pueden deber a la presencia de elementos de la estructura secundaria de la molécula (Brown *et al.*, 1986 en Hoelzel *et al.*, 1991), o de algún marco abierto de lectura (Saccone *et al.* en Hoelzel *et al.*, 1991). Estos bloques conservados no están relacionados con los sitios de unión de los primers más comúnmente utilizados y que producen fragmentos de tan variable longitud. Su presencia podría ser útil en el diseño de primers altamente efectivos para la totalidad de las especies de tortugas marinas.

La gráfica de índices de Shannon-Weaver (Figura 5) es muy similar a la obtenida a partir de los datos de variación por sitio (Figura 4), demostrando que la heterogeneidad de la longitud de las secuencias analizadas no influye en el análisis de la distribución de la variación.

FIGURA 4
Distribución de sitios variables en la región de control de tortugas marinas.

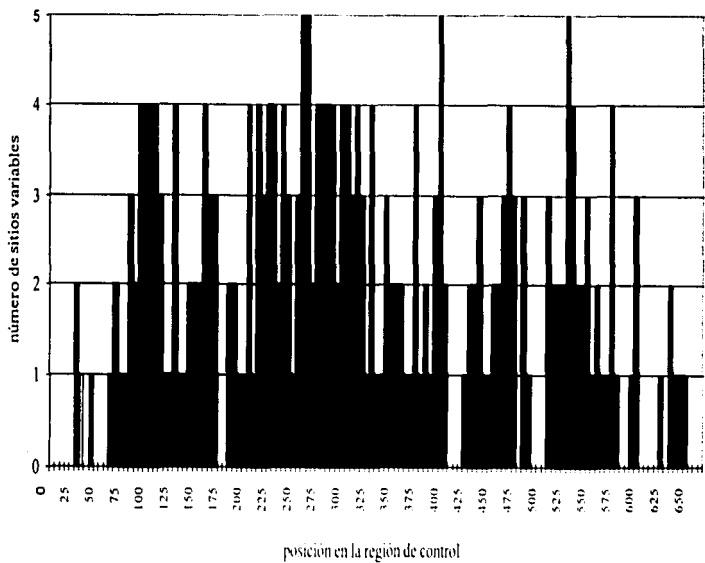


FIGURA 5
 Índices de diversidad de Shannon-Weaver para la distribución de la variación.

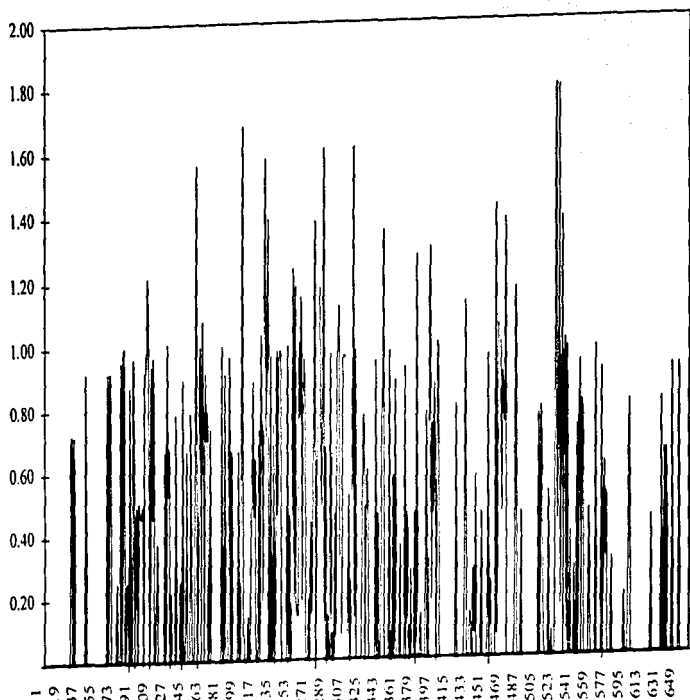


TABLA VI

Bloques completamente conservados encontrados en la región de control de tortugas marinas.

1er bloque	posición	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181						
	nucleótido	C	T	A	T	G	T	A	T	T	A	T						
2o bloque	posición	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
	nucleótido	T	C	A	C	G	A	G	A	A	A	T	A	A	G	C	A	A
3er bloque	posición	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505
	nucleótido	T	A	T	T	C	T	G	G	C	C	T	C	T	G	G	T	T

Composición nucleotídica

En la Tabla VII se muestra la composición nucleotídica promedio para cada género y para el conjunto total de secuencias. Las pruebas de ji cuadrada aplicadas revelan que en todos los casos, la composición nucleotídica observada es significativamente diferente a la esperada, es decir, que no existe una representación homogénea de los cuatro diferentes nucleótidos en el gen. Los nucleótidos A y T son los más abundantes en las secuencias analizadas (Figura 6), tal y como ha sido reportado para la región de control de otros vertebrados como el pez arcoiris (Zhu *et al.*, 1994).

En la Tabla VIII se muestran los valores de coeficiente de variación de la composición nucleotídica para cada género y para el conjunto global. Junto con la Figura 7, este resultado nos revela que la proporción de los nucleótidos A y T es mucho más constante dentro del grupo que la de los nucleótidos C y G.

Los altos niveles de los nucleótidos A y T, y los bajos niveles de los nucleótidos C y G encontrados en este estudio, coinciden con los patrones reportados en otros vertebrados que típicamente son deficientes en G y C (Brown *et al.*, 1993; Arnason *et al.*, 1993; y Wenink *et al.*, 1994).

TABLA VII
 Composición nucleotídica por género.

<i>Dermochelys</i>	35.99	35.09	18.15	10.78	10
<i>Natator</i>	35.47	32.80	18.30	13.50	3
<i>Lepidochelys</i>	34.35	34.33	18.23	13.15	4
<i>Eretmochelys</i>	33.58	34.78	16.46	15.17	25
<i>Chelonia</i>	35.35	31.93	18.59	14.15	40
<i>Caretta</i>	33.43	34.28	18.08	14.25	6
global	34.75	33.40	17.87	14.00	88

TABLA VIII
 Coeficientes de variación para la composición nucleotídica.

<i>Dermochelys</i>	0.36	0.32	0.75	1.48
<i>Natator</i>	2.40	1.72	6.96	1.60
<i>Lepidochelys</i>	2.07	1.89	2.17	5.34
<i>Eretmochelys</i>	1.61	1.32	4.24	4.77
<i>Chelonia</i>	1.61	3.76	8.45	4.36
<i>Caretta</i>	2.84	0.81	6.67	4.36
global	3.17	4.92	8.40	10.10

FIGURA 6
Composición nucleotídica de la región de control para los distintos géneros.

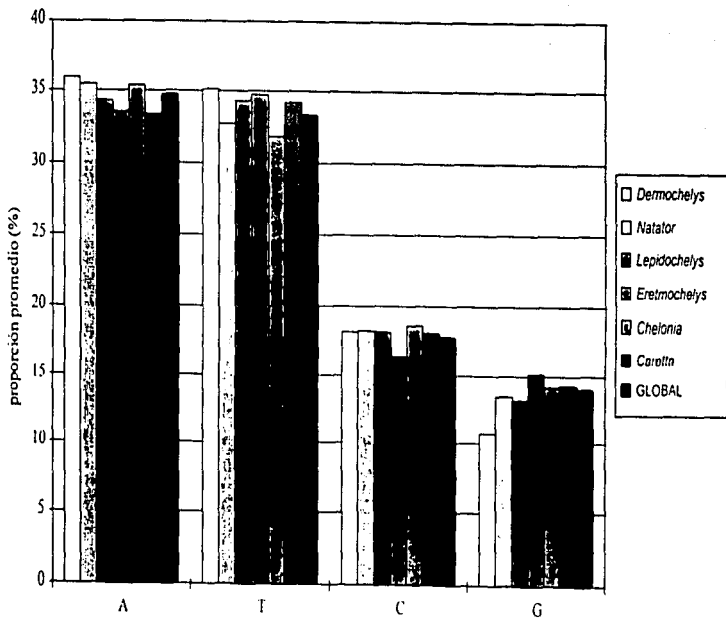
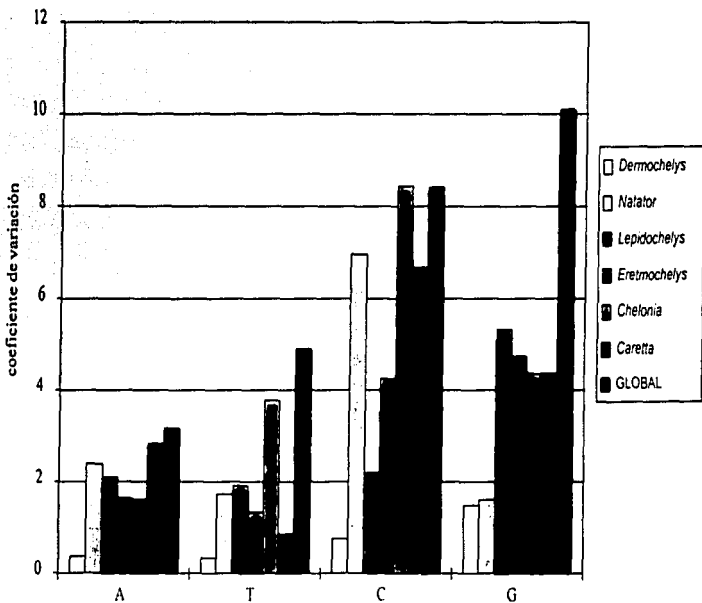


FIGURA 7
 Coeficientes de variación para la composición nucleotídica.



Tipos de sustitución nucleotídica

En la Tabla IX se presentan las medias de las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas de cada tipo de sustitución, en ella se observa que las frecuencias observadas son muy diferentes a las esperadas (Figura 8). Si los cambios se debieran únicamente a la composición nucleotídica, los tipos de sustitución más comunes serían aquellos que involucran a los nucleótidos más frecuentes (A y T), es decir, a la transversión $A \leftrightarrow T$ (que en los valores observados resultó tener una frecuencia de cero) y a los pares idénticos $A \leftrightarrow A$ y $T \leftrightarrow T$. Los valores observados nos indican que, efectivamente, los cambios por nucleótidos idénticos son los más comunes, siendo más frecuentes de lo que se esperaba. Por otro lado, tal y como ha sido reportado para genes mitocondriales de otros vertebrados, tales como el hombre (Aquadro y Greenberg, 1983), lagartijas (Hedges *et al.*, 1991), aves costeras (Wenink *et al.*, 1994) y peces (Zhu *et al.*, 1994), las transiciones resultaron ser mucho más comunes que las transversiones a pesar de que las transiciones fueron menos frecuentes de lo que se esperaba. Las transiciones entre purinas resultaron ser más comunes que entre pirimidinas.

La proporción S/V varía ampliamente entre los vertebrados, desde valores cercanos a uno (Wenink *et al.*, 1994) hasta proporciones altamente sesgadas hacia transiciones (32:1), según se ha reportado en aves (Edwards y Wilson, 1990), peces (Brown *et al.*, 1993) y mamíferos (Moritz *et al.*, 1987). Para poblaciones de tortuga verde del Gran Caribe, la proporción reportada para los 12 haplotipos encontrados en la zona, fue de 10:1 (Lahanas *et al.*, 1994), lo cual concuerda con los altos valores encontrados en el presente trabajo, analizando 40 haplotipos de este género (Tabla X). En general, los valores S/V se encuentran muy por arriba de la unidad, lo cual significa que existe un evidente sesgo hacia las transiciones. La única excepción es el género *Natator*, lo cual puede deberse al reducido número de secuencias analizadas para este género (n=2).

No hay una razón clara para explicar la alta proporción de transiciones en la evolución del mtDNA. Su presencia en RNAs de transferencia, en genes

codificadores de proteínas y en secuencias no codificadoras (Brown *et al.*, 1982 en Aquadro y Greenberg, 1983), sugiere que en parte se puede deber al proceso mutacional *per se* más que a selección en contra de las transversiones, esta idea tiene base en el sesgo transicional producido por medio de un modelo de construcción que aplica consideraciones químicas (Topal y Fresco, 1976 en Aquadro y Greenberg, 1983). Sin embargo, algunos autores han observado que en genes nucleares las predicciones de los modelos de Topal y Fresco están en conflicto con los datos obtenidos. Kunkel y Loeb (1991 en Hedges *et al.*, 1991) sugieren que un candidato efectivo para explicar el sesgo mutacional, es la DNA polimerasa mitocondrial, ya que ha sido demostrado que es cinco veces menos exacta en la replicación que la DNA polimerasa nuclear; sin embargo, queda por examinar el hecho de que la baja fidelidad de esta enzima intervenga en los caminos que llevan al sesgo transicional.

Por otro lado, además de que la tasa de sustituciones transicionales es más veloz que la de sustituciones transversionales en comparaciones entre linajes poco divergentes, la curva de transiciones llega a niveles de saturación más rápidamente que la de transversiones (Bowen *et al.*, 1993a). En la región de control de las tortugas marinas tampoco se observa un efecto de saturación en la tasa de sustituciones transicionales aún a niveles de divergencia mayores a los 60 Ma (Figura 9). Esta observación contrasta marcadamente con los resultados de Bowen y colaboradores (1993a) que encontraron saturación en las tasas de cambios transicionales del citocromo b de las tortugas marinas a partir de unos 40 Ma. Una posible explicación pudiera ser que, con excepción de los bloques conservados (Tabla VI), la proporción de la región de control libre de restricciones evolutivas es muy extensa y no se alcanzan a saturar de sustituciones aún después de los 100-150 Ma de divergencia de las familias Dermochelyidae y Cheloniidae. Esta observación concuerda con la distribución de la variación en prácticamente toda la región de control del mtDNA de estos organismos, en vez de estar localizada en zonas específicas como ocurre en otros taxa.

FIGURA 8
Frecuencias observadas y esperadas de los diferentes tipos de sustitución.

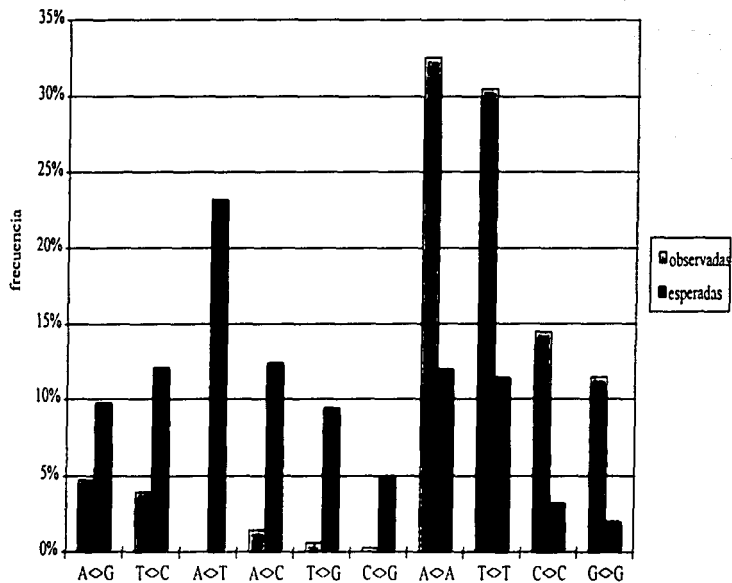


TABLA IX

Frecuencias observadas y esperadas para cada tipo de sustitución.

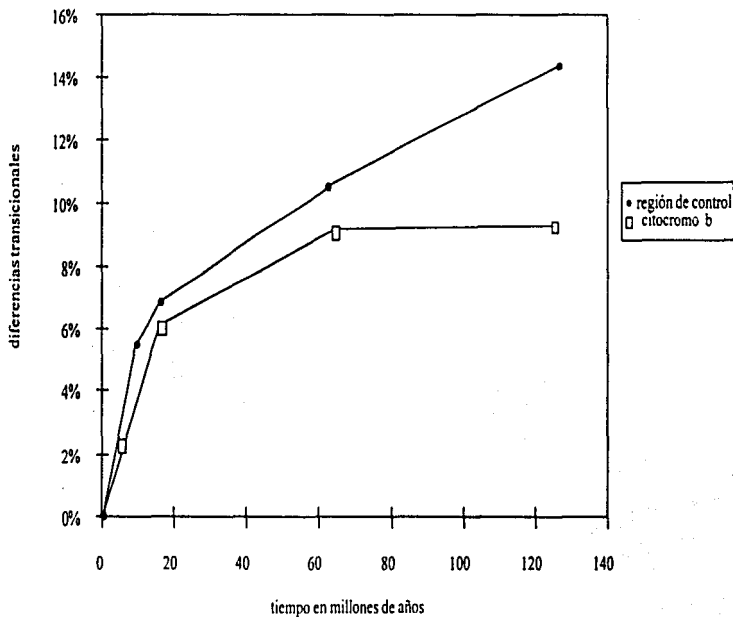
tipo de sustitución	A<>G	T<>C	A<>T	A<>C	T<>G	C<>G	A<>A	T<>T	C<>C	G<>G
frecuencia observada (%)	4.83	3.96	0.00	1.38	0.63	0.27	33.31	29.99	14.31	11.32
frecuencia esperada (%)	9.73	11.93	23.21	12.41	9.35	5.00	12.07	11.15	3.19	1.96

TABLA X

Proporciones S/V por género.

<i>Dermochelys</i>	2.23	1.00 - 4.03
<i>Naturator</i>	0.6	0.40 - 0.81
<i>Lepidochelys</i>	5.22	2.01 - 6.34
<i>Eretmochelys</i>	4.37	0.33 - 9.22
<i>Chelonia</i>	14.09	1.00 - 29.15
<i>Caretta</i>	7.33	0.00 - 16.53
global	4.14	0.33 - 29.15

FIGURA 9
Relación entre tiempo de divergencia y porción de cambios transicionales en la región de control y en el citocromo b de tortugas marinas (datos para el citb de Bowen *et al.*, 1993a).



Arbol de genes

En la Figura 10 se muestra el árbol generado mediante el análisis Neighbor-Joining, a partir de las 88 secuencias de la región de control mitocondrial utilizadas en el presente trabajo. Sobre cada rama se encuentra el nivel de confianza según el remuestreo (en porcentaje), lo cual permite probar la robustez del arreglo topológico.

Los patrones de agrupación producidos reflejan cercanamente la sistemática de las especies comúnmente manejada (Tabla 1), aunque con algunas variaciones:

- a) en la tribu Chelonini encontramos una separación relativamente amplia entre los haplotipos de *C. mydas* del Atlántico y del Pacífico, esta marcada separación entre haplotipos de diferentes cuencas oceánicas representa un rasgo importante de los procesos evolutivos y confirma lo descrito por Bowen y colaboradores (1992) con base en el análisis de RFLPs del mtDNA;
- b) para apoyar una separación a nivel de especie entre *C. mydas* y *C. agassizi*, se esperaría encontrar al menos, un nivel de distancia genética similar en magnitud al encontrado entre *L. olivacea* y *L. kempfi*, sin embargo se observa que los haplotipos de *C. mydas* del Pacífico se encuentran más relacionados con el haplotipo de *C. agassizi* (marcado con una flecha en la Figura 10) que con los de *C. mydas* del Atlántico. Este patrón concuerda con el reportado por Bowen y colaboradores (1993a) con base en el análisis de la secuencia del citocromo b y por Dutton y colaboradores (1996) con base en el análisis de diez secuencias de la región de control; ambos autores sugieren que *C. agassizi* es sólo una forma melanística de *C. mydas* y que éstas se encuentran separadas únicamente a nivel poblacional, los resultados del presente trabajo corroboran esta conclusión;
- c) el género *Natator* se encuentra ubicado en la tribu Chelonini, de acuerdo a lo reportado por Dutton y colaboradores (1996), y a diferencia de lo

encontrado por Bowen y colaboradores (1993a) quienes le ubican dentro de la tribu Carettini;

- d) el género *Lepidochelys* se encuentra dentro de la tribu Chelonini al contrario de lo reportado por Bowen y colaboradores (1993a), y por Dutton y colaboradores (1996), en ambos estudios, este género se encuentra dentro de la tribu Carettini y presenta una estrecha relación con los géneros *Caretta* y *Eretmochelys*;
- e) existe una clara distinción entre las especies *L. olivacea* y *L. kempi* tal y como lo reportan Bowen y colaboradores (1991) a partir del análisis de RFLPs del mtDNA, Bowen y colaboradores (1993a), y Dutton y colaboradores (1996);
- f) en la tribu Carettini encontramos una proximidad entre los géneros *Caretta* y *Eretmochelys*, de acuerdo con los trabajos de Bowen y colaboradores (1993a) y de Dutton y colaboradores (1996), y en discordancia con la clasificación filogenética basada en análisis morfológicos (Hendrickson, 1980);
- g) los haplotipos R, S, T y U del género *Eretmochelys* se encuentran más relacionados con las *Caretta* que con las *Eretmochelys* ya que provienen de individuos híbridos *Caretta-Eretmochelys* (Bass *et al.*, 1996) y representan un aspecto de la evolución de las tortugas marinas que no será discutido en este trabajo.

Existen ciertas disparidades en cuanto al arreglo topológico obtenido en éste y en otros trabajos (Hendrickson, 1980; Bowen *et al.*, 1993a; y Dutton *et al.*, 1996), entre las cuales resalta la ubicación imprecisa de secuencias provenientes de los géneros *Natator* y *Lepidochelys* dentro de las tribus Chelonini o Carettini. Esto nos hace recordar que los análisis de filogenia tienen cierto grado de incertidumbre y que ésta sólo puede abatirse haciendo una ampliación del análisis o usando varios procedimientos. Por ejemplo, evaluando la consistencia de los resultados obtenidos de analizar un mismo conjunto de secuencias bajo diferentes métodos de construcción filogenética; o incorporando varios loci en un mismo análisis.

Los resultados aquí obtenidos, en lo que respecta a contradicciones con otras publicaciones, sugieren la posible existencia de topologías alternativas a las comúnmente aceptadas. Será necesario realizar análisis adicionales para verificar o validar estas observaciones.

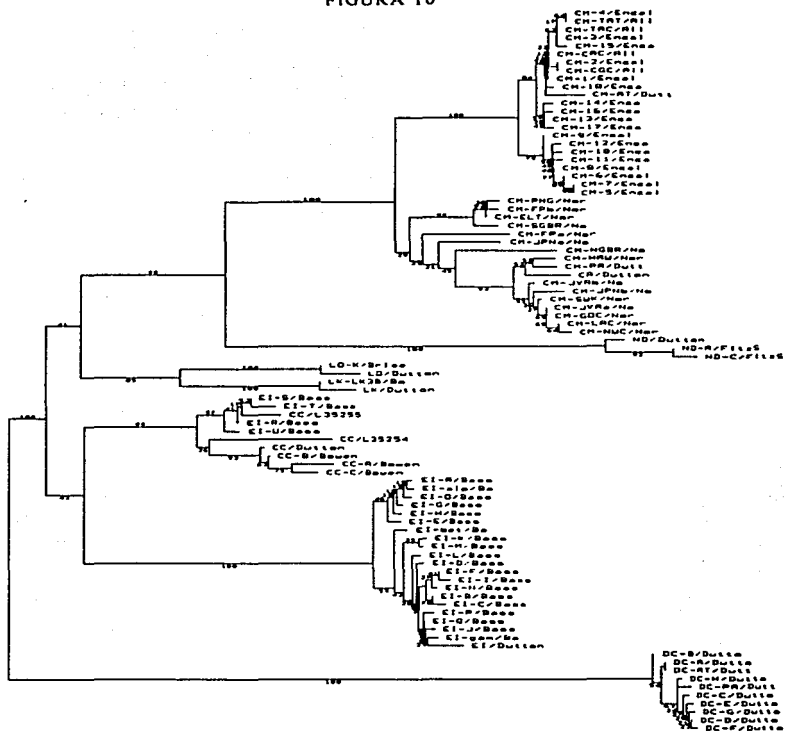
FIGURA 10 (siguiente página)

Arbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining, basado en distancias genéticas obtenidas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura entre los 88 haplotipos estudiados.

Nota:

- Las asignaciones de los haplotipos concuerdan con las especificaciones de la Tabla II.
- La escala en el fondo a la izquierda se encuentra en unidades de distancia genética.

FIGURA 10



- 1) La región de control mitocondrial de tortugas marinas tiene una tasa de sustitución nucleotídica de 0.17-0.32% sustituciones/sitio/linaje/Ma, con base en 88 haplotipos pertenecientes a las siete especies existentes; esta tasa resulta mayor que la reportada para el citocromo b de tortugas marinas (0.1-0.2 sustituciones/sitio/linaje/Ma) y menor que la reportada para la región de control de otros vertebrados.
- 2) No se encontraron evidencias de saturación en las tasas de sustitución para la región de control de tortugas marinas a diferencia de lo reportado anteriormente para el citocromo b.
- 3) La variación de la región de control se encuentra distribuida de manera homogénea a lo largo del gen, al contrario de la acumulación de la variación en los extremos 5' y 3' reportada para otros vertebrados.
- 4) Se presentan tres pequeños bloques completamente conservados entre las 88 secuencias analizadas.
- 5) Los cuatro nucleótidos no se encuentran representados homogéneamente en la región de control de las tortugas marinas, siendo los más abundantes los nucleótidos A y T. La proporción de los nucleótidos A y T es más constante dentro del grupo que la de los nucleótidos C y G.
- 6) Las transiciones son más comunes que las transversiones. Las transiciones entre purinas son más comunes que entre pirimidinas.
- 7) No se observa un efecto de saturación en la tasa de sustitución transicional aún a niveles de divergencia mayores a los 60 Ma.
- 8) Existe una marcada separación entre los haplotipos de *C. mydas* del Atlántico y del Pacífico.
- 9) Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan lo concluido en otros trabajos de genética molecular: debido a la escasa diferenciación que existe entre ellas, *C. agassizi* no es más que una población melanística de *C. mydas*.
- 10) Existe incertidumbre en la ubicación de los géneros *Natator* y *Lepidochelys* en las tribus Carettini o Chelonini.

- Abreu-Grobois, F.A., A.L. Bass, R. Briseno-Duenas, P.H. Dutton, S.E. Encalada y N.N. FitzSimmons. 1996. Mitochondrial DNA D-loop sequences of marine turtles. págs. 147-162 *In*: Bowen, B.W. y W.N. Witzell (eds.) Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics. (pp. 147-162) NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC.
- Allard, M.W., M.M. Miyamoto, K.A. Bjørndal, A.B. Bolten y B.W. Bowen. 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. Copeia 1:34-41.
- Aquadro, C.F. y B.D. Greenberg. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. Genetics 103:287-312.
- Arnason, U., A. Gullberg y B. Widegren. 1993. Cetacean mitochondrial DNA control region: sequences of all extant baleen whales and two sperm whale species. Mol. Biol. Evol. 10:960-970.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18:489-522.
- Avise, J.C., B.W. Bowen, T. Lamb, A.B. Meylan y E. Bermingham. 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. Mol. Biol. Evol. 9(3):457-473.

- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. Nueva York.
- Avise, J.C. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. Conservation Biology 9(3):686-690.
- 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 behaviour and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. Molec. Ecol. 5:321-328.
- Begon, M., J.L. Harper y C.R. Townsend. 1990. Ecology: Individuals, populations and communities. Segunda edición. Blackwell, Oxford.
- Benabib, N.M. y L.E. Cruz. 1981. Las tortugas marinas en México. Naturaleza 3:157-166.
- Bernatchez, L. y R.G. Danzmann. 1993. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). Mol. Biol. Evol. 10:1002-1014.
- 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., W.S. Nelson y J.C. Avise. 1993a. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5574-5577.

- Bowen, B.W., J.C. Avise, J.I. Richardson, A.B. Meylan, D. Margaritoulis y S.R. Hopkins-Murphy. 1993b. 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. USA 92:3731-3734.
- Bowen, B.W., A.L. Bass, A. García-Rodríguez, A. Bolten, C.E. Díez, R. VanDam, K.A. Bjørndal y R.J. Ferl. 1996. Origin of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in a Caribbean feeding area, as indicated by mtDNA sequence analysis. Ecological Applications 6(2):566-572.
- Brown, J.R., A.T. Beckenbach y M.J. Smith. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Mol. Biol. Evol. 10(2):326-341.
- Brown, W.M., G. Matthew Jr. y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(4):1967-1971.
- Cann, R.L., W.M. Brown y A.C. Wilson. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. Genetics 106:479-499.
- Dillon, M.C. y J.M. Wright. 1993. Nucleotide sequence of the d-loop region of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) mitochondrial genome. Mol. Biol. Evol. 10(2):296-305.

- Dutton, P.H. 1995. Molecular evolution of sea turtles with special reference to the leatherback, *Dermochelys coriacea*. Tesis doctoral, Texas A&M University, College Station, TX. 1995.
- Dutton, P.H., S.K. Davis, T. Guerra y D. Owens. 1996. Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 5(3):511-521.
- Edwards, S.V. y A.C. Wilson. 1990. Phylogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of Australian songbirds (*Pomatostomus*). Genetics 126:695-711.
- Encalada, S.E. 1995. Phylogeography and conservation genetics of the green turtle (*Chelonia mydas*) in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Tesis de maestría, University of Florida, Gainesville, FL. 1995.
- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, M.M. Miyamoto y B.W. Bowen. (en prensa). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. Molec. Ecol.
- 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.
- Frair, W. 1982. Serum electrophoresis and sea turtle classification. Comp. Biochem. Physiol. 72B:1-5.

- Greer, A.E., J.D. Lazell y R.M. Wright. 1973. Anatomical evidence for a counter-current heat exchanger in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). Nature 244(5412):181.
- Hedges, S.B., R.L. Bezy y L.R. Maxson. 1991. Phylogenetic relationships and biogeography of Xantusiid lizards, inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol. Biol. Evol. 8(6):767-780.
- Hendrickson, J.R. 1958. The green sea turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus) in Malaya and Sarawak. Proc. Zool. Soc. Lond. 130:455-535.
- Hendrickson, J.R. 1980. The ecological strategies of sea turtles. Am. Zool. 20(3):597-608.
- Herbert, G. y S. Easteal. 1996. Relative rates of nuclear DNA evolution in human and old world monkey lineages. Mol. Biol. Evol. 13(7):1054-1057.
- Hoelzel, A.R., J.M. Hancock y G.A. Dover. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial d-loop region. Mol. Biol. Evol. 8(3):475-493.
- Hughes, G.R. 1986. Sea turtles: A guide. Natal Parks Board, Total South Africa (Pvt) Ltd. Sudáfrica.
- Karl, S.A., B.W. Bowen y J.C. Avise. 1992. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. Genetics 131:163-173.
- Krebs, C.J. 1994. Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance. Cuarta edición. Harper and Collins. Nueva York.

- Kreitman, M. 1983. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. Nature 304:412-417.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111-120.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802. 130 pp.
- Lahanas, P.N., M.M. Miyamoto, K.A. Bjorndal y A.B. Bolten. 1994. Molecular evolution and population genetics of greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. Genetica 94:57-66.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. Science 241:1455-1459.
- Laurent, L., J. Lescure, J. Briolay, B.W. Bowen y C. Gautier. 1995. Structure, evolution and intraspecific variation of the mitochondrial control region of a reptilia: The loggerhead sea turtle *Caretta caretta*. (sin publicar).
- Lee, W.-J., J. Conroy, W. Hunting y T.D. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. J. Mol. Evol. 41:54-66.
- Li, W.-H. y D. Graur. 1991. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Márquez, M.R., A. Villanueva, C. Peñaflores y D. Ríos. 1982. Situación actual y recomendaciones para el manejo de las tortugas marinas de la costa

occidental mexicana, en especial la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*. Ciencia Pesquera. Instituto Nacional de la Pesca, Sría. de Pesca, México (3):83-91.

- Márquez, M.R. 1990. FAO species catalogue. Vol. II: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtles species known to date. FAO Fisheries Synopsis. No. 125, Vol. II.
- Martin, A.P. y S.R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4087-4091.
- Moritz, C., T.E. Dowling y W.M. Brown. 1987. Tandem duplications in animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18:269-292.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, Nueva York.
- Norman, J.A., C. Moritz y C.J. Limpus. 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphism: genetic markers for ecological studies of marine turtles. Molecular Ecology 3:363-373.
- Pritchard, P. 1980. *Dermochelys coriacea*. Catalogue of american amphibians and reptiles. 1-238.4.
- Quinn, T.W. 1992. The genetic legacy of mother goose: Phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. Mol. Ecol. 1:105-117.
- Rand, D.M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. TREE 9:125-131.

- Rzhetsky, A. y M. Nei. 1995. Tests of applicability of several substitution models for DNA sequence data. Mol. Biol. Evol. 12(1):131-151.
- Smith, M.H., H.O. Hillestad, M.N. Manlove, D.O. Straney y J.M. Dean. 1978. Management implications of genetic variability in loggerhead and green sea turtles. págs. 302-312 *In: Proceedings of the 13th International Congress of Game Biologists. Wildlife Society, Washington, D.C.*
- Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 8(6):767-780.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes y A.C. Wilson. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. Science 253:1503-1507.
- Wenink, P.W., A.J. Baker y M.G.J. Tilanus. 1994. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. Mol. Biol. Evol. 11(1):22-31.
- Zhu, D., B.G.M. Jamieson, A. Hugall y C. Moritz. 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). Mol. Biol. Evol. 11(4):672-683.

Amino ácido.- Bloque estructural de las proteínas cuyos grupos funcionales son el grupo amino y el carboxilo, unidos al mismo átomo de carbono (en los α -amino ácidos).

Alineación.- El pareamiento de dos secuencias homólogas.

Amplificación.- Multiplicación del número de copias de un gen o secuencia de DNA, comúnmente por medio de la PCR.

Codificación.- (Ver traducción).

Código genético.- Sistema de codificación en el DNA nuclear y mitocondrial, por medio del cual conjuntos de tres nucleótidos (codones) en genes estructurales especifican cada uno de los amino ácidos que serán expresados al traducirse el gen a proteínas en el transcurso de la transcripción.

Complejo de replicación.- Conjunto de moléculas que llevan al cabo el proceso de síntesis de DNA.

Delección.- La remoción de una o más bases de una secuencia de DNA.

Deriva génica.- Fluctuación de frecuencias alélicas de generación a generación, causada por eventos azarosos, tales como muestreo de gametos.

Divergencia.- La división de una unidad taxonómica en dos.

DNA.- Un polímero macromolecular de nucleótidos unidos en el que el residuo de azúcar es la desoxirribosa, usualmente de doble cadena. El acarreador de la información genética en todos los eucariontes, procariontes y en varios virus.

Electroforesis.- Una técnica que separa partículas disueltas o coloides sujetas a un campo eléctrico de acuerdo a sus movilidades. La movilidad electroforética depende del tamaño, geometría tridimensional y carga eléctrica de la partícula.

Elemento móvil.- Una secuencia que se puede mover en el genoma de un organismo.

Enzimas de restricción.- Aquellas que cortan cadenas dobles de DNA en pequeñas secuencias de nucleótidos específicas.

Estructura secundaria.- En ácidos nucleicos, la estructura de la molécula producida por la formación de puentes de hidrógeno entre amino ácidos o nucleótidos, respectivamente.

Extinción.- El fin de un linaje evolutivo.

Fenotipo.- Características observables controladas genéticamente e influenciadas por el medio.

Flujo génico.- Incorporación de genes en el "pool" génico de una población a partir de una o más poblaciones.

Fragmentos de restricción.- Fragmentos que resultan después de aplicar enzimas de restricción a una molécula de DNA.

Gap.- Símbolos de edición que son insertados en secuencias durante el proceso de alineamiento y que compensan la ocurrencia de inserciones o deleciones supuestas.

Gen.- Una secuencia de DNA o RNA genómico que es esencial para una función específica.

Genoma.- Material genético completo que posee una célula o un individuo.

Grupo parafilético.- Grupo de especies que incluye la especie ancestral pero no todas las especies descendientes conocidas.

Haplotipo.- Composición alélica de uno o algunos genes bajo investigación.

Heterocigosidad.- Una medida de variación genética en una población, calculada como la frecuencia media de heterocigotos sobre todos los loci (heterocigosidad observada).

Homocigosidad.- Estado diploide con alelos idénticos en uno o más loci.

Inserción.- Una mutación en la cual uno o más nucleótidos son insertados en una secuencia de DNA.

Intrón.- Segmento de DNA que es removido durante la transcripción del gen en un proceso de maduración del RNA.

Limitación funcional.- Grado de intolerancia característica de un sitio o un locus a sustituciones nucleotídicas.

Loci.- Plural de locus, sitio en un cromosoma donde un gen particular o un segmento de DNA está localizado.

Marco de lectura.- Secuencia lineal de codones en un gen que codifica para proteínas, que indica el comienzo con un codón de iniciación y el término con el codón correspondiente.

Marco de lectura abierto.- Una secuencia de DNA que es potencialmente traducible a una proteína.

Microsatélites.- Cadenas de nucleótidos muy cortas (una a seis bases) repetidas en "tandem".

Mutante deletéreo.- Mutación que reduce la adecuación de sus portadores.

Nucleótido.- Una molécula compuesta por una base de nitrógeno, un azúcar y un grupo fosfato. Cualquiera de los bloques básicos de construcción de los ácidos nucleicos.

OTU.- Siglas en inglés de la Unidad Taxonómica Operacional. Cualquiera de las unidades taxonómicas bajo estudio.

Par de bases.- Un nucleótido en una cadena de ácido nucleico que se une por un puente de hidrógeno a un nucleótido de la otra cadena de acuerdo a las reglas de apareamiento entre una purina y una pirimidina.

PCR.- Siglas en inglés de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Método de amplificación de una secuencia de DNA a partir de mezclas no purificadas.

Pirimidina.- Un tipo de base nitrogenada presente en los nucleótidos, compuesta por un solo anillo. Las pirimidinas en el DNA son la citocina (C) y la timina (T), mientras que en el RNA son la C y el uracilo (U).

Polimorfismo.- Existencia de dos o más genotipos para una característica dada dentro de una población.

Pool génico.- Total de genes de una población sexual dada.

Pseudogen.- Segmento de DNA sin función que exhibe homología en su secuencia con un gen funcional.

Purina.- Un tipo de base nitrogenada presente en los nucleótidos y compuesta por dos estructuras en forma de anillo unidas. Las purinas en el DNA y en el RNA son la adenina (A) y la guanina (G).

Recombinación.- La situación que surge después de un evento de "crossover", en el cual se producen nuevas combinaciones de alelos.

Región codificadora.- Aquellas zonas del DNA usadas en el proceso de la transcripción, la cual lleva a la producción de una proteína.

Reloj molecular.- Hipótesis que dice que en un gen dado o secuencia de DNA, las mutaciones se acumulan a una tasa aproximadamente constante en todos los linajes evolutivos, en tanto que el gen o la secuencia guarden su función original.

Replicación.- Proceso de síntesis de DNA a partir de un patrón.

RNA.- Polímero macromolecular de nucleótidos unidos, en el cual el azúcar residual es una ribosa. Usualmente de una sola cadena.

RNA mensajero.- Una molécula de RNA que es procesada a partir de un RNA transcrito primario y usado para traducción en amino ácidos.

RNA ribosomal.- El RNA que constituye los compuestos estructurales de un ribosoma.

RNA de transferencia.- Pequeña molécula de RNA que contiene un anticodón, un sitio de unión para un amino ácido específico y sitios de reconocimiento para la interacción con el ribosoma y la enzima que lo une a su amino ácido específico.

Sitio informativo.- Sitio con al menos dos diferentes tipos de nucleótidos, cada uno representado al menos dos veces. Poseen utilidad para el análisis filogenético.

Sitio variable.- Sitio dentro del DNA que es ocupado por un nucleótido diferente entre las secuencias comparadas.

Sustitución nucleotídica.- Mutación en la cual un nucleótido es sustituido por otro. En evolución, la sustitución de un nucleótido por otro que llega a ser fijado en una población.

Tasa de fijación.- Número de alelos que alcanzan la frecuencia de 1 (100 por ciento) en una población por unidad de tiempo.

Tasa de mutación.- Número de mutaciones por locus o sitio nucleotídico por unidad de tiempo.

Tasa de sustitución.- Número de sustituciones nucleotídicas por sitio nucleotídico por unidad de tiempo.

Tiempo generacional.- Tiempo de duración promedio entre dos generaciones sucesivas. Algunas veces definido como la edad promedio de los progenitores a la que dan lugar a su descendencia.

Topología.- Patrón de las ramas de un árbol filogenético.

Transcripción.- Síntesis de una molécula de RNA a partir de un patrón de DNA.

Transición.- La sustitución de una purina por una purina o una pirimidina por una pirimidina.

Transversión.- La sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa.

Alineamiento múltiple de las secuencias completas de haplotipos representativos de cada una de las especies de tortugas marinas. El resto de los haplotipos utilizados en este trabajo puede reconstruirse con base en el Anexo 2. De manera adicional, se muestran subrayados los diferentes primers utilizados para la producción de estas secuencias (tomado de Abreu-Grobois *et al.*, 1996).

tPSA-Thr (K	tPSA-Pro	> similitud a la región de control	
<5' fin de la secuencia		5'	3'
CC/L35255	CTTTCTGTAGA ATAAATCAAAA GAGAAGGGGT CAAGAGCTTCA TGGCCGGTCC CCAAAAGCCG AATCTGTATA TTAAGTATAT CTTTGACACA AAGAGAGCCG 100	5' CCAAAAGCCG AATCTGTAT	Allard <i>et al.</i> , 1994. Primer ITOM
CC/L35254	-----	CAAAAGCCG AATCTGTATA	CTTTGACACA AAGAGAGCCG
CC-A/Bowen	-----	AGAGCTTCA TGGCCGGTCC	CAAAAGCCG AATCTGTATA
CC/Dutton	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA AAGAGAGCCG
CM-7/Encal	-----	-----	-----
CM-1/Encal	-----	-----	-----
CM-TAC/All	-----	TCAAAA GAGAGAGCT TAAAGCTTCA TGGCCGGTCC	CAAAAGCCG AATCTGTATA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
UM-JYNs/No	-----	-----	-----
CM-MGBR/No	-----	-----	-----
CM-SGBR/No	-----	-----	-----
CM-FPA/Nor	-----	-----	-----
CM-BAW/Nor	-----	-----	-----
CM-DVAa/No	-----	-----	-----
CM-A7/Dutt	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
CM-PA/Dutt	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
CA/Dutton	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
EI-A/Bass	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
EI-F/Bass	-----	-----	-----
EI-Q/Bass	-----	-----	-----
EI-R/Bass	-----	-----	-----
EI/Dutton	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
LO-K/Brise	-----	-----	-----
LO/Dutton	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
LF-LF3B/Bo	-----	-----	-----
LF/Dutton	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
ND-A/FitzS	-----	-----	-----
ND-C/FitzS	-----	-----	-----
ND/Dutton	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
DC-A/Butto	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
DC-FA/Dutt	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG
IM-A/Butt	-----	-----	AA TTAAGTATAT CTTTGACACA GGATATAGAG

5'ccgagcacc accattacc(cont)

CC/L35255	---CAACAT	GTAATT---	TACCTATATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCA	ACTTATTAC	200
CC/L35254	---CAACAT	GTAATT---	TACCTATATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	TAATATCCAT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCA	ACTTATTAC	
CC-A/Boven											
CC/Dutton	---CAACAT	GTAATT---	TACCTATATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	TAATATCCAT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCA	ACTTATTAC	
CM-7/Encal	T---GTCCAC	ACAACCTAAC	TACCTAAATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
CM-1/Encal	T---GTCCAC	ACAACCTAAC	TACCTAAATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
CM-TAC/All	T---GTCCAC	ACAACCTAAC	TACCTAAATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
CM-JPNa/No	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CM-NGBR/No	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CM-SGBR/No	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CM-FPa/Kor	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CM-HAW/Kor	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CM-JVAa/No	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CM-AT/Dutt	T---GTCCAC	ACAACCTAAC	TACCTAAATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
CM-PA/Dutt	T-GTCCACG	ACAACCTAAC	TACCTAAATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
CA/Dutton	T-GTCCACG	ACAACCTAAC	TACCTAAATT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
EI-A/Bass	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
EI-F/Bass	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
EI-Q/Bass	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
EI-R/Bass	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
EI/Dutton	CG-CCACAC	ATAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
LO-K/Brise	-----	-----	---CTTAACT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
LO/Dutton	G-CCAAAGT	ATAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
LK-LK39/Bo	-----	-----	---CTTAACT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
LK/Dutton	CG-CCAAAGT	GTAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
ND-A/Flt:5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
ND-C/Flt:5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
ND/Dutton	CGTCCACAC	ACAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
DC-A/Dutto	---CAACAT	ATAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
DC-PA/Dutto	---CAACAT	ATAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	
DC-AT/Dutt	---CAACAT	ATAAACT---	TACCTTATTT	CTCTCCCGTG	CCGACACAGAA	CAATGTCCGT	AATACCTA-T	CTATGGATTA	TGGACATCT	ACTTATTAC	

cac3' Norman et al., 1994. Primer TCR5

CC/LJ5255 CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGTACAT GACTATTAGA 300
 CC/LJ5254 CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGTACAT GACTATTAGA
 CC-A/Bowen ---TAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGTACAT GACTATTAGA
 CC/Dutton CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGTACAT GACTATTAGA
 CM-7/Encal CAATAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-1/Encal CAATAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-TAC/Al1 CAATAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-JPa/No ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-N2BR/No ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-SGBR/No ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-FPa/Nor ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-HA/Nor ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-JVa/No ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-AT/Dutt CAATAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CM-Fa/Dutt CAATAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 CA/Dutton CACTAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-A-TATTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 E1-A/Bass ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -AAATACAT GACTATTAGA
 E1-F/Bass ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -AAATACAT GACTATTAGA
 E1-Q/Bass ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -AAATACAT GACTATTAGA
 E1-R/Bass ---TAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -AAATACAT GACTATTAGA
 E1/Dutton CACTAGCATG TGACCAGTAA TATTACACAT TGTATTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -AAATACAT GACTATTAGA
 LO-K/Brise CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 LO/Dutton CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 LM-LK3B/Bo CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 LM/Dutton CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT AA-ACCTGTTT -TAGACACAT GAATATTAAAG
 ND-A/Fitz5 ---AA-TAGTGGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT GA-TATTTT -TAGTACAT GAATATTAAAG
 ND-C/Fitz5 -----AA-TAGTGGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT GA-TATTTT -TAGTACAT GAATATTAAAG
 ND/Dutton CACTAGCATG TGATCAGTAA TGTGTGGCAT TAACTTGGCC CTAAACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT GA-TATTTT -TAGTACAT GAATATTAAAG
 DC-A/Dutt CACTAGCATG TATCTAGTAA TATTACACAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT TAT-TT-ATT -TAGTACAT GACTATTAGA
 DC-PA/Dutt CACTAGCATG TATCTAGTAA TATTACACAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT TAT-TT-ATT -TAGTACAT GACTATTAGA
 DC-A/Dutt CACTAGCATG TATCTAGTAA TATTACACAT TAACTTGGCC TTAACACAT-A AAAAAATTACT AATTTTGGCAT TAT-TT-ATT -TAGTACAT GACTATTAGA

5'atgg aactgacata gparata' Allard et al., 1994. Primer L001

CC/L3255 CA-GGA--A T--AGGATG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG 400
 CC/L3254 CA-GGA--A T--AGGATG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 CC-A/Bowen CA-GGA--A T--AATATG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 CC/Dutton CA-GGA--A T--AATATG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 CM-7/Encal CA-GAGG--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC CTAAAT-AGG
 CM-1/Encal CA-GAGG--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC CTAAAT-AGG
 CM-TAC/All CA-GAGG--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC CTAAAT-AGG
 CM-3/Na/No CA-GAGA--G TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 CM-NGBR/No CA-GAGA--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 CM-SGBR/No CA-GAGA--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 CM-FP/Not CA-GAGA--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 CM-HW/Not CA-GAGA--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 CM-N/Na/No CA-GAGA--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 CM-N/T/Dutt CA-GAGG--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC CTAAAT-AGG
 CM-PA/Dutt CA-GAGG--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC CTAAAT-AGG
 CA/Dutton CA-GAGA--A TT--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAAT-AGG
 EI-A/Bass CA-GGA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 EI-F/Bass CA-GGA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 EI-Q/Bass CA-GGA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 EI-R/Bass CA-GGA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 EI/Dutton CA-GGA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 LO-F/Brise AA-GATG--A T--AATATG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 LO/Dutton AA-GATG--A T--AATATG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 LX-LK3B/Bo AA-GGTA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 LK/Dutton A-GGTA--A T--AAAAGTG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 ND-A/Fitz CA-GGA--A AT--AGAGAGG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 ND-C/Fitz CA-GGA--A AT--AGAGAGG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 ND/Dutton CA-GGTA--A TC-PA-GGTA AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 PG-D/Dutt CA-GATA--A ATAGGATAG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 DC-PA/Dutt CA-GATA--A ATAGGATAG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG
 DC-A/Dutt CA-GATA--A ATAGGATAG AAGTGTATA GGCATATATA TTAACCAT ATTCTGACG ATGATATGCG TCGACATAT AGGTATTTC TTAGTCCAG

CC/LJ3255	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAAG-TCA	TATCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	500
CC/LJ3254	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	TCCTTGTTAG	TAAATACAAA	TATTACCGAT	TTCAAGTCCA	-TTAAG-TCA	TGTCTGACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
CC-A/Bowen	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACACG	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAAG-TCA	TATCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
CC/Dutton	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAAG-TCA	TATCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-7/Encal	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-1/All	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-TAC/All	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-JFNa/No	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-SGBR/No	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-SGBR/No	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-FPa/No	TATTACGAG	AAATAAGCAA	TCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-HAH/No	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-JVa/No	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-AT/Dutt	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CM-PA/Dutt	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
CA/Dutton	TATTACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-TTGGATCT	ATTCTGGCCCT	
EI-A/Bass	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	TCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTCAAT-CTG	TGGCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
EI-F/Bass	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAA-TTA	TGGCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
EI-Q/Bass	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAA-TTA	TGGCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
EI-R/Bass	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAA-TTA	TGGCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
EI/Dutton	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAG	TAAATACAAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	-TTAA-TTA	TGGCGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
LO-K/Brise	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
LO/Dutton	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
LK-LK3B/Bo	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
LK/Dutton	TCATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
ND-A/Flitz	TAAATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTG	TGGCGTACAT	AAATGATCT	ATTCTGGCCCT	
ND-C/Flitz	TAAATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTG	TGGCGTACAT	AAATGATCT	ATTCTGGCCCT	
ND/Dutton	TAAATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	GATTACCGAT	TTCAAGGCCA	TTAA--CTG	TGGCGTACAT	AAATGATCT	ATTCTGGCCCT	
DC-A/Dutto	TAAATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	TATTACTAGT	TTCAAGGCCA	-TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
DC-PA/Dutt	TAAATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	TATTACTAGT	TTCAAGGCCA	-TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	
DC-AT/Dutt	TAAATCACGAG	AAATAAGCAA	CCCTTGTTAA	AAATATACAA	TATTACTAGT	TTCAAGGCCA	-TTAA--CTA	CGAGGTACAT	AA-CTGATCT	ATTCTGGCCCT	

CC/L35255 CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGTA A-TAAAGTTC ACTCGTTCCT CTTTAAAGG CCTCTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA 600
 CC/L35254 CTGGTTGGT TTTTCAGGCA CATTAAAGCA G-TAAAGTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTCTGGTT CAAGT----A AATGAGTTC ATACATTAA
 CC-A/Boven CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGTA G-TAAAGTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTCTGGT ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CC/Dutton CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGTA G-TAAAGTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTCTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-7/Encal CTGGTTA-GC TTTTCAGGCA CATTAAAGTA G-CAGAGTTC ATTCTGTCC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG CCTTGGTTG AATGAGTTC ATACATTGA
 CM-1/Encal CTGGTTA-GT TTTTCAGGCA CATTAAAGTA A-CGAGCTTC ATTCTGTCC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-TAC/All CTGGTTA-GT TTTTCAGGCA CATTAAAGTA A-CGAGCTTC ATTCTGTCC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-JPNa/No CTGGTTG-TT CTTTCAGGCA CATAAAATA G-TAAGCTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-NGBR/No CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATAAAATA G-TAAGCTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-SGBR/No CTGGTTG-TT CCTTCAGGCA CATAAAATA A-CGAGCTTC ATTCTGTCC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-FPa/No CTGGTTG-TT -TTTCAGGCA CATAAAATA G-TAAGCTTC ATTCTGTCC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-HAW/No CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATAAAATA A-TAAGCTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-JVAa/No CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATAAAATA G-TAAGCTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-A7/Dutt CTGGTTA-GT TTTTCAGGCA CATAAAATA A-CGAGCTTC ATTCTGTCC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CM-Fa/Dutt CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATAAAATA A-TAAGCTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 CA/Dutton CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATAAAATA A-CHPCTTC ATTCTGTCT CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 EI-A/Bass CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT G-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 EI-F/Bass CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT G-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 EI-D/Bass CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT G-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 EI-R/Bass CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 EI/Dutton CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT G-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 LO-R/Brise CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 LO/Dutton CTGGTTG-GG TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG CAGCA---TA AATGAGTTC ATACATTGA
 LK-LK13/Bc CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 LK/Dutton CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-TAAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTA ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 ND-A/Flitz CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-CAGAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATCCATGAA
 ND-C/Flitz CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-CAGAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATCCATGAA
 ND/Dutton CTGGTTG-TC TTTTCAGGCA CATTAAAGT A-CAGAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATCCATGAA
 DC-A/Dutto CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT T-TAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 DC-PA/Dutt CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT T-TAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA
 DC-AT/Dutt CTGGTTG-TT TTTTCAGGCA CATTAAAGT T-TAAGTTC AATGAGTTC CTTTAAAGG CCTTTGGTTG ----- AATGAGTTC ATACATTAA

3'attgga ccgatgccc tca5' Allard et al., 1994. Primer HDCh1

3' ccgatgccc tcadaatgaa catgcctg5' Norman et al., 1994. Primer TCR6

fin de la secuencia 3' > 660

CC/L35255 TTTAARCT GGCATACGGT GGTITTACTT GCATATAGTA GTCITTTTTT TCTCTTTGTG continúa 358 bases más >
CC/L35254 TTTAARCTT GGCATACGGT GGTITTACTT GCATGCGGTA GTCITTTTTT TCTCTTTGTG continúa 404 bases más >
CC-A/Bowen -----
CC/Dutton TTTA-----
CM-7/Encal TTTA-----
CM-1/Encal TTTA-----
CM-TAC/All TTTAARCTT GGCATACGGT AGTITTACTT GCATATAGTA GTCITTTTTT TCTCTTTGTG
CM-JFNa/No TTTAARCTT -----
CM-NBRa/No TTTAARCTT -----
CM-SBRa/No TTTAARCTT -----
CM-FPa/Nor TTTAARCTT -----
CM-FRW/Nor TTTAARCTT -----
CM-JVAs/No TTTAARCTT -----
CM-AT/Dutt TTTA-----
CM-PA/Dutt TTTA-----
CA/Dutton TTTA-----
EI-A/Bass TTTAARCTT -----
EI-F/Bass TTTAARCTT -----
EI-Q/Bass TTTAARCTT -----
EI-R/Bass TTTAARCTT -----
EI/Dutton TTTA-----
LO-K/Brise TTTAARCTT GGCATACGGT AGTITTACTT -----
LO/Dutton TTTA-----
LK-LP3B/Bo TTTAARCTT GGCATACGGT AGTITTACTT -----
LK/Dutton TTTA-----
ND-A/FitzS TTTAARCTT -----
ND-C/FitzS TTTAARCTT -----
ND/Dutton TTTA-----
DC-A/Dutto TTTA-----
DC-PA/Dutt TTTA-----
DC-AT/Dutt TTTA-----

ESTA TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

Composición nucleotídica en sitios variables de los diferentes haplotipos de la región de control de las especies de tortugas marinas (tomado de Abreu Grobois *et al.*, 1996).

Caretta caretta

posición:	1111222222	2222333333	3444444555	5555555555	566
	5578334455	5568011377	9244557022	3346677777	733
haplotipo	1902580945	6775456723	9101572889	1928901234	557
CC/L35255	CGTCTGT-AT	TTGTGAGACG	GCACGCA-AT	ATCIT-----	-AA
CC/L35254	TA..CAC..C	..G..TA	.T.TATGGGC	G.T..GCAAG	TGG
CC-A/Bowen	-----AT.	--ACA.TG.A	A.G.....G.	G.T--.....	--
CC-B/Bowen	-----AT.	--AC..T..AG.	G.T--.....	--
CC-C/Bowen	-----A.AT.	--AC..TG.A	A...A...G.	GCT--.....	--
CC/ Dutton	TA.T.....	..AC..T..AG.	G.T.....	--

Dermochelys coriacea

posición:	112	22333
	7456	88136
haplotipo	5007	02694
DC-A/Dutton	AGGA	GCITA
DC-B/DuttonT...
DC-C/Dutton	..AG	A...G
DC-D/Dutton	...G	A...G
DC-E/Dutton	...G	...G
DC-F/Dutton	...G	A..CG
DC-G/Dutton	...G	A.C.G
DC-H/Dutton	A...G
DC-PA/Dutton	CA.-	A...G
DC-AT/Dutton

Chelonia mydas

posición:	111111	11111122	222222222	222222222	222333333	33333344444	4444445555	555555555	555555555	55
haplotipo	8999000000	14558802	2345555666	666777888	889012456	77899922566	6778880011	122333355	7171777778	99
CM-7/Encal	-TAA-GTCA	AGAGCGAA	AG-AACGAA	TTA-ATATG	AAAGACAC	CAGCAGCA	CGGATAGCT	TGGCATCA	CGTTGGTGTG	GA
CM-1/EncalA.GGTTGTA.GAAA
CM-2/EncalTA.GGTTGTA.GAAA
CM-3/EncalTA.GGTTGTA.GAAA
CM-4/EncalTA.GGTTGTA.GAAA
CM-5/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-6/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-8/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-9/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-10/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-11/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-12/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-13/EncalA.GATTGTA.GAAA
CM-14/EncalA.GATTGTA.GAAA
CM-15/EncalTA.GGTTGTA.GAAA
CM-16/EncalA.GATTGTA.GAAA
CM-17/EncalA.CATTGTA.GAAA
CM-18/EncalGGTTGTA.GAAA
CM-CAC/All	G.....GGTTGTA.GAAA
CM-CGC/All	G.....TA.GGTTGTA.GAAA
CM-TAC/All	G.....TA.GGTTGTA.GAAA
CM-TAT/All	G.....TA.GGTTGTA.GAAA
CM-JPN/NoGGTTGTA.GAAA
CM-JPNb/NoGGTTGTA.GAAA
CM-NGB/NoGGTTGTA.GAAA
CM-SGB/NoGGTTGTA.GAAA
CM-PHG/NorGGTTGTA.GAAA
CM-ELT/NorGGTTGTA.GAAA
CM-FPB/NorGGTTGTA.GAAA
CM-FPB/NorGGTTGTA.GAAA
CM-BAM/NorGGTTGTA.GAAA
CM-GOC/NorGGTTGTA.GAAA
CM-LAC/NorGGTTGTA.GAAA
CM-ANC/NorGGTTGTA.GAAA
CM-JVA/NoGGTTGTA.GAAA
CM-JVAb/NoGGTTGTA.GAAA
CM-SWK/NorGGTTGTA.GAAA
CM-AT/Dact	T.....G.G.	A.GGTGTA.GAAA
CM-PA/Dact	G.....GTCACG	TTATACG	G.GTGTA.GAAA

Eretmochelys imbricata

posición:	2222222222	222222222222	2333333333	3344444444	4445555555	555555
haplotipo	1111222223	34445566808	9012344445	682556666	777222334	444555
EI-A/Bass	3467023675	802345126245	8266945679	911454689	0234578012	578178
EI-A/Bass	ACAGGACCTC	ACAA--GGTAAC	AAGGTAGTAA	CGTAGATT	AGGTGATGGT	ACTTGA
EI-B/Bass	..G.....	..CAA.....	..G.....	..T.C.....	..C.....	..A.
EI-C/Bass	..GA.....G.....	..T.C.....	..C.....	..A.
EI-D/Bass	..G.....T.....	..C.....	..A.
EI-E/BassG.....
EI-F/Bass	..G.....C.....	..G.....	..T.C.....	..C.....
EI-G/BassA.....
EI-H/BassA.....T.....
EI-I/Bass	T.G.....C.....	..G.....	..T.C.....	..C.....
EI-J/Bass	..G.....C.....T.C.....	..C.....
EI-K/Bass	..G.....C.....C.....	..C.....
EI-L/Bass	..G.....C.....T.C.....	..CA.....
EI-M/Bass	..G.....C.....C.....
EI-N/Bass	..G.....C.....	..G.....	..T.C.....	..CA.....
EI-O/BassG.....
EI-P/Bass	..G.....C.G.....T.C.....	..C.....
EI-Q/Bass	..G.....C.....T.C.....	..C.....
EI-alpha/BassC.....
EI-beta /BassC.....T.C.....	..G.....
EI-gamma/Bass	..G.....C.....T.C..G.....	..C.....
EI/Dutton	..G.....	..G...C...	..T.....	..T.CG.....	..C.....	..A.
EI-R/Bass	..T..AGTTCT	GTT.ATAA.TGT	..AA.ACCC	..AC.A.G.C	..AT.AGAAC	GITCCA.
EI-S/Bass	..T..AGTTCT	GTT.ATAA.TGT	..AA.ACCC	..AC.A.G.C	..AT.AGAAC	GITCCAG
EI-T/Bass	..T..AGTTCT	GTT.ATAA..GT	..AATACC	..AC.A.G.C	..AT.AGAAC	GITCCAG
EI-U/Bass	..T..AGTTCT	GTT.ATAA.TGT	..AA.ACCC	..AC.A.G.C	..AT.A..ARC	GITCCAG

Nota

- los guiones significan "gaps"
- los puntos significan bases idénticas
- las posiciones se leen verticalmente