

00366

5



**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
Universidad Nacional Autónoma de México.**



**Análisis genético poblacional de las tortugas carey
(*Eretmochelys imbricata*) en sitios de alimentación en aguas
del Estado de Campeche, México.**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias
(Biología Marina)**

Presenta:

Irazema González Martínez Olivares

Director de Tesis:

Dr. Federico Alberto Abreu Grobois

Comité Tutorial:

**Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Dra. Ana María Ibarra Humphries**

Mazatlán, Sinaloa, noviembre del 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: HAZEL GONZALEZ

MARTINEZ OLIVERA

FECHA: 12-NOV-2023

FIRMA: [Firma]

A mis Luises

*A las mujeres,
a las mujeres que además son amas de casa,
a las mujeres que además son esposas,
a las mujeres que además son estudiantes,
a las mujeres que además trabajan,
a las mujeres que además son hermanas,
a las mujeres que además son abuelas,
a las mujeres que además son madres,
a las mujeres que además son hijas.*

A mis papás y al Enano

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca y al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por todas las facilidades brindadas.

Al proyecto "Hawksbill sea turtle foraging ground abundance, Campeche, México" a cargo del Biol. Vicente Guzmán por los recursos, muestras e información de las tortugas otorgados para esta investigación al igual que a su patrocinador la National Fish and Wildlife Foundation.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por las facilidades y recursos para realizar esta investigación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular y por supuesto a mi asesora, la Dra. Alejandra García, Ale gracias por tu dedicación y sobre todo por tu tiempo, gracias por todo lo que me enseñaste, no tienes idea de lo importante que fue el trabajar contigo, no solo en lo profesional.

A todo el equipo del CIAD gracias por su asesoría en el laboratorio a la M. en C. Rubi Hernández Cornejo, a QFB. Carmén Bolán Mejía, a Roxana y a Briscia por su disponibilidad en cualquier momento.

A la M. en C. María de los Angeles Herrera por su ayuda y asesoría con todo el trabajo de laboratorio y Mari...por todos tus detalles, a Karla por escucharme siempre.

Al Matemático Germán Ramírez y al Lic. Carlos Suárez por su asesoría en el análisis estadístico y computacional. A Clara Ramírez por su eficiente forma de ver la vida. A Natalia y a Magali por su amistad y a todos los que de alguna manera hicimos esto, porque sin lugar a dudas este es un trabajo colectivo.

Al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nueva York a cargo del Dr. Pérez y a la QFB. Asalia Olivares por su ayuda en la estandarización de la secuenciación.

Muy especialmente a mis demás asesores de posgrado, a la Dra. Ana María Ibarra por compartir su conocimiento a quien agradezco su confianza, disponibilidad y amistad en todo momento, por exigirme más. Al Dr. Bruno Gómez-Gil por su asesoría durante el trabajo de laboratorio en el CIAD y por sus acertadas recomendaciones para la elaboración de este trabajo. Al Dr. Horacio Merchant por introducirme en diferentes caminos de la ciencia; sin lugar a dudas creo que tuve mucha suerte al tenerlos a todos ustedes como asesores, sinceramente creo que son pocas las ocasiones en que personas con tal conocimiento, valía y disponibilidad se conjuntan, muchas gracias.

Quise dejar al final el agradecimiento para mi director de tesis, el Dr. Alberto Abreu, porque no tengo palabras para agradecerle su conducción académica, por compartir no solo su *expertise* en tortugas marinas y genética sino además por su empatía y paciencia en cada momento, de verdad muchas gracias.

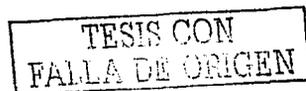
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Resumen.....	1
1. Presentación.....	2
2. Introducción	3
3. Antecedentes.....	6
A. El Ciclo de Vida de la Tortuga Carey.....	6
B. Distribución de la Especie en México.....	6
C. Importancia de la Tortuga Carey.....	7
D. Biología de la Especie.....	9
E. Ecología.....	11
F. Estado de Conservación.....	13
G. Tendencia de las Poblaciones.....	14
H. Problemática de la Especie.....	18
I. Genética de Poblaciones, ADN mitocondrial.....	18
J. Análisis de ADN.....	21
4. Justificación.....	23
5. Planteamiento del Problema.....	24
a. Hipótesis Nula.....	24
b. Hipótesis Alterna	24
6. Objetivos.....	25
a. Objetivo General.....	25
b. Objetivos Específicos.....	25
7. Metodología.....	26
a. Muestreo y Manejo de Organismos.....	26
b. Preservación de las muestras.....	27
c. Tamaño y periodicidad de las muestras.....	27
d. Destino de las muestras de sangre.....	29
e. Extracción de ADN.....	29
f. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	33
g. Purificación del ADN.....	35

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

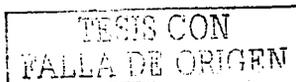
h. Reacción de Secuenciación.....	36
i. Análisis Estadístico.....	39
i. Prueba de χ^2	39
ii. Análisis de stocks mezclados.....	39
iii. Análisis de Talla y Peso.....	40
8. Resultados.....	41
a. Muestreo.....	41
b. Extracción de ADN.....	41
c. Diseño de cebadores y PCR.....	42
d. Purificación de ADN.....	43
e. Secuenciación.....	45
f. Composición haplotípica en sitios de alimentación	50
i. Comparación de composición entre sitios.....	52
ii. Correlación Talla y Peso vs Haplotipos.....	52
iii. Análisis de stocks mezclados.....	60
9. Discusión.....	62
10. Conclusiones.....	68
11. Literatura Citada.....	70
Apéndice A: Colección de muestras.....	78
Apéndice C: Electroforesis.....	80
Apéndice D: Purificación.....	81
Apéndice E: Clonación.....	87
ANEXO 1: Haplotipos de la región control del ADN mit.....	94
ANEXO 2: Datos de colecta en sitios de alimentación.....	95
ANEXO 3: Alineación de haplotipos de la región control del ADN mit.	96



INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

7. Metodología.....	26
7.1 Protocolo para la Extracción de ADN con Cloruro de Sodio.....	31
7.2 Protocolo para la Extracción de ADN con Fenol/Cloroformo.....	32
7.3 Parejas de cebadores con los que se experimentó la PCR.....	34
7.4 Protocolo de termociclado para la Amplificación del ADN mitocondrial.....	34
7.5 Mezcla maestra de reactivos para PCR.....	35
7.6 Protocolo para la purificación de ADN amplificado por PCR.....	36
7.7 Mezcla maestra para reacción de secuenciación.....	37
7.8 Composición haplotípica en las colonias de tortuga carey del Atlántico occidental. Aquí se compila toda la información disponible a la fecha..	40.1
8. Resultados.....	41
8.1 Sitios de alimentación y el número de muestras recibidas y secuenciadas por sitio.....	41
8.2 Resumen del número de muestras extraídas mediante cada una de las técnicas de extracción de ADN por sitio de muestreo.....	42
8.3 Determinación de la calidad de ADN de acuerdo a la absorbancia.....	42
8.4 Ensayos de Purificación de productos PCR.....	44
8.5 Primer secuencia obtenida a partir de la clonación correspondiente al haplotipo EIA023.....	47
8.6 Muestra secuenciada a partir de la clonación correspondiente al haplotipo EIA001.....	48
8.7 Número de secuencias en función de los haplotipos encontrados.....	50
8.8 Clasificación de Haplotipos de acuerdo a Bass , 1996 y Díaz- Fernández <i>et al.</i> , 1999.....	50
8.9 Clasificación de Haplotipos en función del sitio de muestreo.....	51
8.10 Prueba de χ^2 para composiciones haplotípicas entre los sitios de muestreo.....	51



8.11 Distribución de frecuencias para la Talla (cm).....	53
8.12 Resumen de Estadística Descriptiva para la Talla (cm).....	54
8.13 Resumen de Medidas de Dispersión y Tendencia Central para la Talla agrupándolos en función del haplotipo	54
8.14 Distribución de frecuencias para el Peso (Kg)	56
8.15 Resumen de Estadística Descriptiva para el Peso (Kg)	57
8.16 Resumen de Medidas de Dispersión y Tendencia Central para el Peso agrupándolos en función del haplotipo	57
8.18 Análisis Bayesiano de mezcla de stocks utilizando el paquete "Turtle" de Bolker <i>et al</i> , (en prep.).....	61

FIGURAS

7. Metodología	26
1 Sitios de muestreo.....	29
8. Resultados	41
8.1 Amplificación de segmentos de aproximadamente 850 bases que pertenece a la región control del ADN mitocondrial	43
8.2 Vista de gel de secuenciación comparado con genes clonados.....	46
8.3 Histograma de Frecuencias para la Talla (cm).....	53
8.4 Distribución de la Talla de acuerdo al haplotipo (gráfica de cajas)	55
8.5 Histograma de Frecuencias para el Peso (Kg)	56
8.6 Distribución del Peso de acuerdo al haplotipo (gráfica de cajas)	58
8.7 Distribución de la Talla de acuerdo al sitio de muestreo (gráfica)	59
8.8 Distribución del Peso de acuerdo al sitio de muestreo (gráfica)	59
8. Discusión	62
8.1 Trayectoria de boyas tomadas desde 1978 al 2003 en el mar Caribe.....	66

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La tortuga carey, *Eretmochelys imbricata*, al igual que las demás especies de tortugas marinas, exhibe un prolongado ciclo vital que incluye extensas migraciones entre hábitats de alimentación y reproducción. A pesar de que las colonias reproductoras se comportan como unidades demográficas independientes ("stocks") y son identificables por métodos genéticos, en sus sitios de alimentación generalmente convergen varios stocks que en casos extremos se originan en una diversidad de colonias de la región. Un manejo y conservación responsable de esta especie, considerada en "peligro crítico de extinción" por la UICN, requiere un cuidadoso seguimiento de la condición de los stocks individuales además de un conocimiento de a dónde se desplazan y en qué proporciones, durante las diferentes etapas del ciclo de vida. Con el fin de esclarecer estas interrogantes, este trabajo tuvo como objetivo el estimar la composición de stocks en sitios de alimentación de la tortuga carey en aguas del estado de Campeche, México, en frente de las playas donde ocurren las mayores anidaciones de tortuga carey en la cuenca del Atlántico. Se analizaron 130 secuencias de la región control de ADN mitocondrial provenientes de individuos en etapa juvenil (entre 30-80 cm de longitud curva de carapacho) muestreados en las temporadas 2000 y 2001 en aguas someras frente de Isla Aguada, Punta Xen, Chenkan y Sabancuy. Aplicando un método Bayesiano de análisis de mezcla de stocks, se comparó la composición haplotípica encontrada en los sitios de alimentación con las de posibles orígenes en colonias anidadoras de la Península de Yucatán y de la región del Caribe. Los resultados indican que las colonias de la Península de Yucatán contribuyen prácticamente la totalidad de los individuos (98.2%; I.C. 94.1-100.0). Una presencia en bajas frecuencia del haplotipo E1A001 en los muestreos sugiere que una pequeña proporción de los individuos podría ser originaria de Cuba, Barbados o Antigua debido a que este haplotipo es endémico allá, o alternativamente podría ser originaria de playas de Campeche debido a que también allí se descubrió este haplotipo aunque en muy bajas frecuencias. Los patrones de los resultados sugieren que la segunda es la respuesta más aceptable, aunque no es posible descartar la primera. La contribución estimada para el resto de las poblaciones regionales cae por debajo del límite de detección del análisis. Ya que estos resultados contrastan con los resultados de todos los trabajos previos que demuestran la presencia de varios stocks regionales en sitios de alimentación, se analizaron posibles explicaciones alternas. La mejor explicación se sustenta en el singular patrón de corrientes que afecta las costas de Campeche. Mientras que en otros sitios del Caribe, las corrientes son capaces de transportar organismos entre diversos puntos distantes, y probablemente ser causantes principales de las mezclas observadas, en el caso del Golfo de México la mezcla de aguas foráneas es mínima y la mayoría tendería a ser arrojada hacia Florida. Esto podría facilitar un relativo aislamiento de los hábitats de la tortuga carey, haciéndolos más impermeables a la inmigración que en las otras regiones estudiadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. PRESENTACIÓN

Este informe es el resultado del análisis genético de muestras de la Tortuga Carey obtenidas de sitios de alimentación en las costas de Campeche. El trabajo de laboratorio fue realizado en las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL, UNAM) Unidad Académica Mazatlán y en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán. La obtención de muestras para el análisis fue realizada por el Biol. Vicente Guzmán Hernández encargado del proyecto de evaluación de Tortugas Marinas en Campeche de la Dirección General de Vida Silvestre (SEMARNAT) en Ciudad del Carmen Campeche. Además de la obtención de tejidos, este grupo integró toda la información biométrica de las tortugas. Sin la colaboración del Biol. Vicente Guzmán Hernández este trabajo no hubiera sido posible ya que su conocimiento, experiencia y trabajos realizados con respecto a la Tortuga Carey fueron de vital importancia para la realización de esta investigación.

La Península de Yucatán es la unidad Geopolítica más importante de *Eretmochelys imbricata* en la cuenca del Atlántico (Meylan y Donnelly, 1999) destacando también a escala mundial por los resultados sostenidos en los programas de conservación. Y de esta región el estado de Campeche no solo aporta las cantidad más importante de nidos de Tortuga Carey, sino también alberga importantes sitios de alimentación en las aguas someras de su mar territorial. El conocer el origen poblacional de estas agregaciones permitirá coadyuvar a la conservación y protección de la especie a nivel regional.

2. INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas tienen un ciclo de vida complejo, el estudiarlas y darles un seguimiento continuo para garantizar su conservación ha sido un reto difícil que los especialistas en tortugas marinas han enfrentado durante largo tiempo. La necesidad de conocer la dinámica de sus poblaciones (unidades demográficas) y su distribución en tiempo y espacio es un objetivo indispensable para su conservación.

En las tortugas carey no se pueden utilizar rasgos morfométricos para distinguir unidades demográficas y aunque el seguimiento de tortugas marcadas con placas metálicas proporciona información valiosa no es eficiente dado su poca practicidad. La metodología que ha sido aplicada exitosamente para resolver estas dificultades es aquella que distingue las Unidades de Manejo (UM) por medio de diferencias en secuencias de su ADN, variabilidad que se utiliza como "marcador molecular" y que, por definición, permite identificar poblaciones que se comportan como agrupaciones reproductivamente aisladas (Awise, 1994). Así estudios recientes de las secuencias del ADN mitocondrial (ADNmit), contribuyeron con avances importantes, esclareciendo varios vacíos o inconsistencias en el conocimiento de las tortugas marinas (Awise, 1994). Por ejemplo, esta herramienta de análisis ha permitido comparar el grado de relación genética entre los géneros de tortugas marinas (Bowen *et al.*, 1993), o conocer la estructura genética en escala mundial de las tortugas caguama, *Caretta caretta* (Bowen *et al.*, 1994) y de la tortuga verde, *Chelonia mydas* (Bowen *et al.*, 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Analizando la región control del ADN mitocondrial se pueden encontrar niveles significativos de diferenciación genética entre colonias anidadoras, con lo que se ha podido confirmar la tendencia de las tortugas marinas a regresar a su playa de nacimiento cuando alcanzan la madurez sexual (comportamiento conocido como "filopatría"). Este resultado ha sido confirmado en poblaciones de tortugas carey del Caribe (Bass, 1996).

En el Caribe los análisis de ADN mitocondrial han demostrado que las poblaciones anidadoras pueden ser distinguidas genéticamente, y que en las áreas de alimentación se encuentra un conjunto de poblaciones compuesto por una mezcla de individuos provenientes de distintas áreas de anidación (Bass 1999; Díaz-Fernández et al.1999). (Milliken y Tokunaga 1987; Meylan y Donnelly 1999).

Tanto estos estudios como los realizados en poblaciones de Australia (Broderick et al. 1994, Bass 1994, Bowen 1996) sugieren que los sitios de alimentación son de suma importancia ya que en ellos se encuentran individuos de diversas poblaciones, lo que es determinante para la adecuada instrumentación de tratados internacionales sobre recursos compartidos.

Se desea que las tortugas marinas mantengan la sustentabilidad de sus funciones ecológicas. No se sabe con certeza cuántas tortugas son requeridas para el sostenimiento de un ecosistema. A través de marcadores genéticos será posible identificar por lo menos en dónde se localizan las poblaciones y cómo se distribuyen.

Para tratar de conocer el comportamiento de la tortuga marina y su impacto en el ecosistema, el estudio que sugieren los expertos se debe remitir a los sitios de anidación y alimentación (Bjornal 1999). El estudio de los sitios de anidación permitirá conocer a las poblaciones existentes , así como la cantidad de individuos que nacen por año, y su desarrollo. Por otro lado, estudiando los sitios de alimentación donde las tortugas pasan el resto del año se podrá conocer la contribución de las diferentes colonias de anidación.

El propósito de este trabajo es el estudio de un sitio de alimentación particular en el estado de Campeche, donde el número de anidaciones representa el 64% del total de las anidaciones de la tortuga carey en el Caribe (Guzmán-Hernández, 2001), donde pueden convergir distintos stocks con necesidades de conservación distintas. Para este estudio se utilizó el ADNmit como marcador molecular para identificar los diferentes stocks y utilizando un análisis estadístico se identificó la contribución de las diversas colonias anidadoras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. ANTECEDENTES

A. El ciclo de vida de la Tortuga carey.-

La tortuga carey, *Eretmochelys imbricata* se localiza en aguas subtropicales y tropicales entre las latitudes 25° N y 35° S. Sus sitios de anidación están situados en áreas tropicales. Después de eclosionar, las crías inician una fase de desarrollo en aguas pelágicas durante un período de tiempo poco conocido. Al finalizar esta fase, cuando alcanzan una talla de aproximadamente 20 cm de longitud recta de carapacho (LRC), modifican sus hábitos e inician una fase asociada a ambientes bénticos, fundamentalmente alrededor de sus áreas de alimentación asociadas con arrecifes principalmente de coral, donde abunda su principal alimento (esponjas) y donde además existen sitios protegidos para reposo. Una vez alcanzada la talla de madurez sexual, en ciclos más o menos regulares de 2-3 años, las tortugas se trasladan a sus áreas de reproducción (cercanas a las playas). Muchas veces estos dos hábitats se encuentran separados por distancias considerables (cientos o miles de kilómetros), para lo cual frecuentemente deben de cruzar aguas territoriales de diferentes países (Bass, 1994; Díaz-Fernández *et al.*, 1999).

B. Distribución de la Especie en México.-

Mientras que la tortuga carey anida en ambos litorales del país, sus principales sitios de reproducción ocurren en playas del Golfo de México y Caribe mexicano, desde Veracruz hasta Quintana Roo (exceptuando Tabasco). Las anidaciones en

Veracruz no se consideran de importancia por lo que las principales áreas en las que se han realizado prospecciones y trabajo de conservación se localizan fundamentalmente en playas de la Península de Yucatán (Guzmán-Hernández, 2001):

- **Campeche:** playas de Chacahito, Isla del Carmen, Isla Aguada, Sabancuy, E. Zapata, Chenkan, Punta Xen, Ensenada Xpicob, San Lorenzo, Isla Arenas
- **Yucatán:** playas de Celestún, El Palmar-Sisal, Telchac, Río Lagartos-Coloradas, El Cuyo.
- **Quintana Roo:** playas de Isla Holbox, Isla Contoy, Isla Cancún y Majahual (Guzmán, 1998).

Además, en las zonas someras de fondo duro como son los bancos de arrecifes de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, abundan las zonas de alimentación a las que llegan las tortugas una vez que transforman sus hábitos del ambiente pelágico al béntico, pueden llegar como juveniles o posteriormente como adultos entre temporadas de reproducción (Garduño, 1997).

C. Importancia de la tortuga carey.-

La abundancia de la tortuga carey ha disminuido severamente, para el siglo xx muchas de sus poblaciones se encontraban ya en franco declive o en una fase de virtual extinción (Meylan, 1989).

Las tortugas tienen un valor histórico irremplazable, con un significado místico, importancia artística y gastronómica, y posiblemente su captura representó uno de los principales alicientes para la migración de pueblos, que en la búsqueda de tan preciado animal se desplazaron a lo largo de islas y costas.

La tortuga carey ha sido utilizada principalmente por su concha, aunque la carne y sus huevos también son vendidos dependiendo del país (Witzell, 1983 citado por Broderick et al., 1994). Por todos estos factores, la carey ha sido fuertemente diezmada a lo largo de los años.

En todos los países donde abunda la tortuga carey, se le ha aprovechado tradicionalmente para una diversidad de usos y productos, en particular el caparazón que es muy apreciado para la elaboración de artesanías y artículos de joyería. Aunque los testimonios iniciales de su explotación se remiten a épocas precolombinas, fueron los colonizadores europeos quienes iniciaron el comercio a gran escala para satisfacer mercados del Viejo Continente. Es en éste periodo, cuando se inició la disminución de las entonces abundantes poblaciones de carey. Ciertamente el interés principal de este comercio fue, y continúa siendo, los altos precios alcanzados por los escudos del carapacho de la tortuga carey.

Todavía en años relativamente recientes (1976-78) las exportaciones mundiales de carey alcanzaron más de 970 toneladas, equivalentes a 1 - 1.4 millones de tortugas (Mack et al., 1979). En México, de acuerdo a Márquez et al. (1976) la producción de carey en 1973 fue de 4.9 toneladas (3,000 - 3,600 tortugas). El comercio de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tortuga carey (legal o ilegal), prevalece hasta la fecha y la presión sobre las poblaciones de carey, es común en todas las áreas de distribución. Según Parsons (1972) esta especie ha soportado la explotación más prolongada y sostenida comparada con el resto de las especies, y evidentemente se refleja en la condición crítica de peligro de extinción que se le ha asignado (Meylan, 1989; Eckert, 1995).

Si bien el mayor impacto a las poblaciones de tortugas carey es causado por la explotación directa, tanto de juveniles y adultos para su carne y concha, otros factores de impacto son: i) el saqueo de huevos en las playas de anidación, ii) algunos artes de pesca de manera incidental, iii) la transformación de playas de anidación para desarrollos turísticos o urbanos e, iv) incrementos de la presencia del ser humano en los sitios de anidación que ahuyentan a las reproductoras (Abreu-Grobois, 1996).

D. Biología de la Especie.-

La tortuga carey o "hawksbill" (pico de halcón) como se le conoce en inglés, recibe su nombre científico de *Eretmochelys imbricata* género introducido en 1843 por Fitzinger, mientras que el nombre de *imbricata* es atribuido a Linnaeus (1766) por referencia al característico traslape de los escudos de su caparazón.

La tortuga carey es un animal de talla mediana, esto es una hembra típica apenas excede los 90 cm de longitud recta de carapacho (LRC). Los adultos de la región del

Caribe oscilan entre 80 y 95 cm . Las crías miden de 39 a 46 mm y el peso varía entre 14 y 20 g. (Eckert 1995a, b; Pritchard y Mortimer 1999).

Las tortugas carey tienen dos pares de escamas prefrontales entre los ojos, escudos gruesos traslapados en la sección distal final del caparazón, cuatro pares de escudos costales y cinco escudos vertebrales, así como dos uñas en cada aleta. El movimiento de sus aletas en tierra es asimétrico (alternado). La cabeza es relativamente angosta y alargada. Su pico se afina hacia la punta para darle el aspecto característico de "pico de halcón". Los colores del carapacho tienen escudos de un diseño muy llamativo (un patrón irregular con colores negro y café sobre un fondo ámbar).

Haciendo referencia al resto de las tortugas marinas, la tortuga carey (*E. imbricata*) se clasifica de acuerdo a la siguiente sistemática del grupo de chelonios: En la actualidad se han descrito solamente dos familias:

- ✓ Cheloniidae, con seis especies en cinco géneros:

Caretta caretta

Chelonia mydas

Eretmochelys imbricata

Lepidochelys kempii

Lepidochelys olivacea

Natator depressus

- ✓ Dermochelyidae, con un solo género y especie:

Dermochelys coriacea

La tortuga marina forma parte del orden de los Testudines, dado que tiene un caparazón óseo, las costillas están fuera del cuerpo, no hay dientes y el pico es de queratina. Forma parte de la clase Reptilia ya que los huevos no dependen del agua (cleidoicos), hay pulmones presentes, respiración aérea y escamas. La súper clase a la que pertenecen es la Tetrápoda por tener cuatro extremidades llamadas aletas. El sub-phylum es el Vertebrata por tener un esqueleto y el phylum cordata por la adquisición de una espina dorsal. Finalmente se toma en cuenta dentro del Reino Animalia ya que las células poseen una membrana nuclear, mitocondrias, pared celular, además de ser posible la fecundación, la meiosis, digestión interna y la existencia un sistema nervioso (Witzell, 1983).

Para *E. imbricata* se considera que el género es monotípico. Se han descrito dos subespecies *imbricata* en el Atlántico y *squamata* en el Pacífico sobre la base de las diferencias en la coloración y forma del carapacho. Aun así, en la literatura reciente y los trabajos de genética solo se reconoce una sola especie.

E. Ecología.-

Como todas las tortugas marinas, la tortuga Carey presenta un ciclo de vida complejo, necesita de varios ecosistemas para poder sobrevivir: 1) las playas para la incubación de los huevos, 2) la zona pelágica, 3) las áreas de alimentación en zonas someras cercanas a las costas particularmente asociadas a arrecifes

coralinos 4) y, finalmente, los sitios de reproducción que podrían encontrarse cercanos a las playas donde anidan las hembras (Frazier, 2001).

La tortuga carey puede llegar a vivir entre 20 y 40 años antes de madurar sexualmente, puede reproducirse durante 10 años más después de alcanzar la madurez, sin embargo esto no es garantía de una alta población dada la cantidad de tortugas que no alcanzan su madurez por el exterminio en estadios desde huevo, cría o juvenil. Frazier en 1999 concluye que uno de cada 1000 individuos llega a fase adulta. Por lo mismo durante las primeras etapas de vida, la tortuga permanece en áreas bentónicas. En su fase post-cría, son pelágicas y se refugian en los "hileros" asociados a la zona de convergencia donde se encuentran algas y detritus flotante, como el poliestireno, bolas de alquitrán y pedazos de plástico (Meylan, 1984a). La tortuga carey reingresa a las aguas costeras cuando mide entre 20 y 25 cm. Una vez que fijan su residencia, se alimentan de esponjas, las cuáles constituyen el 95.3% del peso seco total de los compuestos alimenticios encontrados en el tracto digestivo. Esto sugiere cierta selectividad del componente protéico llamado espongina y colágeno. Por lo tanto se considera dependiente de una alimentación de los fondos rocosos, lo que hace que sean muy vulnerables a las condiciones de deterioro de los arrecifes (Meylan, 1984b).

En latitudes tropicales anida en playas de baja y alta energía, regresando a los sitios de reproducción cada 2 o 3 años. El pico de anidación ocurre entre julio y octubre. Durante la anidación sólo las hembras salen a la playa tardando entre 1 y 3 horas para regresar al mar. Colocan en promedio cinco nidos por temporada en

intervalos de 14 a 16 días. El tamaño de la nidada es variable: 155 en Antigua, 137 en México (Frazier, 1991) y 136 en Brasil. El diámetro de los huevos es de 40 mm con un período de incubación de 60 días. La tasa de eclosión es típicamente alta alrededor del 75%.

Las tortugas marinas son organismos con un ciclo de vida complejo y prolongado, modulado por extensas migraciones cíclicas entre hábitats aptos para su reproducción, desarrollo y alimentación. Debido al lento crecimiento y maduración tardía representa un recurso escaso. En muchos casos, su vasta área de distribución se localiza en aguas territoriales de dos o más países. Esta particularidad dificulta el estudio y la evaluación de las tendencias demográficas. Como especie en riesgo de extinción, la definición de las prioridades de conservación y acciones de manejo han representado un reto para los responsables de la protección de este recurso natural (Meylan *et al.*, 1997).

F. Estado de Conservación.-

Históricamente las poblaciones de esta especie han sido objeto de una pesca intensiva y como resultado de ello, la reducción o desaparición de varias poblaciones en toda su área de distribución está ampliamente documentada. Actualmente es considerada como una especie en diversos grados de peligro de extinción de acuerdo a los criterios de diferentes organismos nacionales e internacionales de conservación -.en la Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies Silvestres en Peligro (CITES) y la Convención sobre Especies Migratorias

(CMS) se le tiene catalogada en el Apéndice I, reservado a las especies en mayor peligro crítico de extinción.

En 1996, aplicando los nuevos criterios para la "Lista Roja" de la UICN (Unión Mundial para la Conservación) se le identificó como *especie en peligro crítico de extinción*- la categoría de peligro de extinción más grave. En México, se le considera como una especie en peligro de extinción de acuerdo a la NOM-059-ECOL-1994. También se lista en el Apéndice II como en peligro de extinción crítico en el Protocolo SPAW (Specially Protected Areas and Wildlife).

G. Tendencia de las Poblaciones.-

Los registros contemporáneos de las áreas de anidación muestran un comportamiento disperso, y no en grandes concentraciones como ocurre en otras tortugas marinas. Sin embargo, este comportamiento puede ser el resultado de la reducción en las poblaciones en las últimas décadas (Carr & Meylan, 1980). Algunos reportes consideraban que la tortuga carey tenía un comportamiento menos migratorio que otras tortugas, pero esto ha sido refutado al demostrar que algunas hembras se trasladan cientos de kilómetros entre temporadas de reproducción (Meylan, 1982), o inclusive que existen algunas tortugas que llegan a anidar en más de una playa dentro de su área de distribución. Aún así, existe una tenacidad o fidelidad en las hembras para regresar a su sitio de anidación, lo cual fue demostrado por medio del seguimiento de hembras marcadas con placas metálicas (Limpus *et al.*, 1983).

Estudios recientes sobre la distribución de la variabilidad genética, practicados a poblaciones de tortuga carey en el Caribe, y sustentados en la comparación de las frecuencias haplotípicas de la región control del DNA mitocondrial (ADNmit), demostraron un alto grado de diferenciación genética entre las colonias reproductoras de esa región (Bass *et al.*, 1996). Este resultado se interpreta como la ocurrencia de una falta de conexión reproductiva entre las colonias analizadas y, por ende, se resalta la necesidad de administrar cada colonia como Unidades de Manejo (UM) independientes. Sobre la base de esos datos, se ha determinado que las tortugas carey agregadas en áreas de alimentación de Puerto Rico (Bowen *et al.*, 1996) y Cuba (Meylan *et al.*, 1997) provienen de colonias reproductoras distribuidas en varios países de la región (Bowen *et al.*, 1996), aunque en muchos casos (como México y Cuba) parece ser que la mayoría habita sitios de alimentación en aguas territoriales del mismo país (Díaz-Fernández *et al.*, 1999)

Datos provenientes de la recuperación de marcas, telemetría satelital y análisis genéticos indican que los adultos pueden viajar grandes distancias entre los hábitats de forrajeo y alimentación (Meylan 1999a; Bass 1999).

En la tortuga carey de Australia los patrones son un poco más complejos ya que mientras que existen diferencias significativas entre las colonias de la región noroeste y noreste, dentro de estas dos zonas la diferenciación genética es insignificante (Broderick *et al.*, 1994), indicando que las mismas unidades de manejo utilizan más de una playa para anidar. Este resultado es consistente con los

estudios del mercado que indican desplazamientos de tortugas entre hábitats vecinos dentro de las regiones (Limpus *et al.*, 1983).

A detalle Broderick *et al.* en 1994 hacen el primer estudio genético de la tortuga carey, demostrando stocks múltiples en las aguas Australianas. Señala que las poblaciones de carey en aguas australianas no están conectadas por cantidades significativas de flujo génico y deben ser consideradas como entidades separadas para su manejo. Bass *et al.* en 1996 señalan que existen 6 diferentes poblaciones en el Caribe y en el Atlántico occidental. Este análisis se llevó a cabo a través también del estudio del ADN mitocondrial, demostrándose así que las poblaciones reproductivas son aisladas eficazmente por escalas de tiempo ecológicas, sugiriendo planes de conservación para estas especies a nivel de nidos. Este trabajo será esencial en este estudio debido a que se utilizará como referencia la comparación de secuencias del mismo locus.

Bowen *et al.* (1996) sugieren que debido a la naturaleza errante de la tortuga carey, trasladándose de sitios de anidación a sitios de alimentación como parte de su ciclo reproductivo, en la mayoría de los casos no se sabe de qué población reproductiva se originan los individuos mezclados en determinados sitios de alimentación. Para resolver esto, analizaron la composición de stocks comparando las frecuencias de los sitios de alimentación contra las colonias anidadoras de la región, concluyendo que los sitios de alimentación no son solo visitados principalmente por tortugas de zonas de anidación cercanas o vecinas, sino que pueden llegar de distintos lugares del Caribe. En contraste, Díaz-Fernández *et al.* (1999), con base en el análisis de

secuencias de la región control del ADNmit de tortuga carey en sitios de alimentación de Cuba (donde se lleva a cabo extracción de tortuga carey), Puerto Rico y México (dos países en donde la explotación de las tortugas marinas está prohibida) encuentran que el 40%-70% de los individuos proviene de poblaciones anidadoras cercanas (dentro del mismo país). Con esto se abre nuevamente la discusión sobre el comportamiento de las carey y del grado de impacto sobre recursos provenientes o compartidos con otros países que co-ocurren en sitios de mezcla, como en los hábitats de alimentación.

El estudio de la Tortuga Carey: En una compilación bibliográfica de 122 citas en el 2001 sobre genética de la conservación, evolución molecular y estructura de poblaciones y otros tópicos relacionados con tortugas marinas se encontró que solamente el 14% hace referencia a la tortuga carey, lo cual es un indicativo de lo relativamente poco que se ha estudiado a esta especie, en comparación con la atención brindada a las demás tortugas (Frazier, 2001).

Por otro lado, los resultados de los esfuerzos de conservación dirigidos a poblaciones de tortuga carey en la Península de Yucatán, han mostrado una tendencia clara de recuperación desde la última década (Garduño et al., 1999). Las causas y el grado de influencia de todos los factores que han contribuido al restablecimiento de las colonias reproductoras es difícil de explicar, aunque pudieran ser los resultados sinérgicos de los diferentes programas de conservación aplicados a las tortugas marinas en México, principalmente la protección intensiva a las áreas de anidación desde finales de los 70's, y la veda total establecida en 1990.

H. Problemática de la especie

Desde hace 1000 años las tortugas han sido capturadas para la obtención de piel, aceite, huevo, carapacho y carne (Frazier, 1999). En el caso de la tortuga carey se sabe que entre 1970 y 1986, 250,000 individuos fueron aniquilados para la utilización de su carapacho en Japón (Bass, 1999). En la segunda mitad del siglo XX (1972-1992), fueron exportadas 754 toneladas de carapachos hacia el mercado japonés, lo que equivale a 712,000 tortugas durante ese período (el 53% provino de América Latina y el Caribe). Para el caso de América, donde a pesar de la existente legislación en algunos países en contra de la matanza de tortugas marinas, se sabe que en Guatemala, país que en 1989, ostentaba en su pequeña costa caribeña con 300 a 800 nidos de tortuga carey diez años después las cifras de anidación no superan la centena. En Costa Rica desde 1985 y hasta 1998 la captura legal fue de 1,800 tortugas por temporada; traduciéndose, sólo para 1998, en un ingreso mínimo de \$270,000 USD y superior a los US \$540,000, Esto da un valor de tortuga viva por \$150 USD.

I. Genética de Poblaciones, ADN mitocondrial

El aterrizar este estudio en la rama de la genética de poblaciones es importante desde el punto de vista de conservación. Los resultados del presente estudio podrán ser aplicados en la determinación de la composición genética inherente de los diversos sitios de alimentación a los que emigran estas tortugas. En sentido

estricto, el objetivo de la genética de poblaciones es entender la división demográfica de esta especie expresada en su ADNmit debido a la migración

La fuente más importante de variación genética es la mutación, la cual representa un cambio en la secuencia del ADN que puede ser heredado. La mutación incluye cambios en la secuencias de nucleótidos (sustituciones, deleciones, inversiones, inserciones o translocaciones). La migración permite que las mutaciones se dispersen en las subpoblaciones (Hartl & Clark, 1997). Dado el estudio al ADNmit esa dispersión se va a llevar a cabo en función de las hembras.

El 99% del material genético en células eucarióticas reside dentro del núcleo, y el 1% restante está en las mitocondrias (y cloroplastos). El ADNmit en los vertebrados es una molécula circular de entre 15,000 y 18,000 pares de bases. Es un ADN bastante conservado, lo que quiere decir que el cambio en la secuencia de nucleótidos es mínimo. Sin embargo este cambio mínimo puede dar características únicas a diferentes poblaciones que podrían revelar desde patrones de migración, hibridación hasta análisis taxonómico (Anderson *et al.* 1981). El ADN mitocondrial es utilizado como marcador molecular para la diferenciación de stocks desde 1971 con los trabajos de Boyer en las pesquerías (Ryman and Utter, 1987).

Cada molécula de ADNmit codifica en su secuencia para 2 ARN ribosomales, 22 ARN de transferencias, 13 polipéptidos y la llamada región control (d-loop) la cual es requerida para la replicación. Estos genes no son interrumpidos por intrones (Borst & Grivell, 1981) como ocurre comúnmente con el ADN nuclear. La mitad de

estos genes codifican para el ARN ribosomal y el ARN de transferencia utilizado para la síntesis de proteínas, mientras que la otra mitad codifica para proteínas que son utilizadas en la fosforilación oxidativa. De acuerdo a estudios realizados por Brown & Simpson (1981), la mayor tasa de mutaciones ocurre en la región del d-loop y la menor tasa en los genes de ARN. De acuerdo a Brown (1982) las mutaciones parecieran ser aleatorias a lo largo del ADN nuclear y mitocondrial, sin embargo inserciones y deleciones de 1 a 10 pares de bases en el ADN mitocondrial ocurren mucho más frecuentemente que en el ADN nuclear. Esto es lo que hace al ADNmit tan importante en la identificación de poblaciones.

Por todo lo anterior, se puede resumir que el ADN mitocondrial tiene dos características primordiales para la identificación de stocks: evolución rápida y herencia materna. El ADN mitocondrial evoluciona de 5-10 veces más rápido que el ADN nuclear (Brown *et al.* 1979), esto es, evoluciona al reemplazarse 1% del ADN en un millón de años (Brown 1980, Ferris 1983c), lo que también puede decirse como que 10×10^{-9} sustituciones por nucleótido ocurren al año. De acuerdo a Hartl y Clark (1997) la alta tasa de mutaciones se debe a la incorporación errónea de nucleótidos durante la replicación y la baja eficiencia de reparación de la encima reparadora ADN polimerasa en la mitocondria, ya que a diferencia de la encima ADN polimerasa del ADN nuclear, la polimerasa del ADN mitocondrial no tiene la función de "proofreading" o chequeo.

Dentro del estudio de ADN mitocondrial se considera relevante mencionar el dogma acerca de la herencia únicamente materna. Aunque se considera que no hay

contribución paterna del esperma para el ADNmit sí puede ocurrir como un evento raro. Por otro lado un estudio de Avise *et al.* (1984) no encontró evidencia de ADN mitocondrial a un nivel de confianza de 5%. Para este tipo de estudios la posible transmisión paterna se considera irrelevante, ya que un 99.9% del material es heredado de la madre (Gyllensten *et al.* 1985).

Se resume:

- El ADN mitocondrial (en la mayoría de los animales) es relativamente pequeño.
- Está presente en copias múltiples por célula.
- En ADN mitocondrial no se recombina, por lo que puede mostrar el origen directo más fácilmente que el nuclear.
- Evoluciona rápidamente.
- Es heredado por vía materna únicamente.

J. Análisis de ADN

Para el estudio de poblaciones, a lo largo del tiempo, se han establecido varios métodos desde el análisis mismo de la variación genética expresada en proteínas por Smith *et al.* (1978); pasando por el análisis de polimorfismos en las longitudes de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN, hasta finalmente la secuenciación directa de nucleótidos (Avise, 1994 citado por Briseño 1998). Para el trabajo con ADN la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite, con tan solo una pequeña cantidad de muestra, amplificar millones de veces un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

segmento particular de ADN. Todos estos componentes han sido muy importantes, sin embargo lo que hasta ahora ha probado su utilidad en la identificación de poblaciones es el análisis del ADN mitocondrial, debido a la herencia exclusiva por vía materna. Las altas tasas de variación de la región control del ADN mitocondrial aumentan la probabilidad de detección de divergencias entre poblaciones, además de considerar un tamaño de población efectiva reducido con relación al ADN nuclear (Awise, 1995 citado por Briseño 1998).

Además de que los análisis de ADNmit han sido ya utilizados en zonas de mezcla de poblaciones como son los sitios de alimentación por Bass en 1996 y Bowen en 1996 para la tortuga Carey, es importante tener el mismo marco de referencia para tener una comparación efectiva.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. JUSTIFICACIÓN

El manejo de cualquier especie requiere darle un seguimiento a lo largo de su ciclo de vida completo. La historia de vida de las tortugas marinas implica que mientras para la reproducción las poblaciones se segregan, en las fases de desarrollo y de alimentación ocurre una mezcla de stocks. Existe metodología que permite rastrear tortugas marinas por marcaje con placas metálicas y/o el rastreo vía satélite. Sin embargo, dichas técnicas presentan una visión parcial de las migraciones y del grado de mezcla en hábitats compartidos. El uso de análisis genéticos permite añadir información complementaria con base en el conocimiento de las diferencias genéticas entre colonias. Así, es posible utilizar alelos (o haplotipos en el caso de ADNmit) específicos de colonias, o la distribución diferencial de las frecuencias haplotípicas, para estimar cuáles colonias de anidación contribuyen a sitios de alimentación y en qué proporción lo hacen.

Dado que las poblaciones de la tortuga carey del Caribe presentan diversos estados de conservación y dinámicas poblacionales, el conocer cuales stocks están presentes permite adecuar las políticas de manejo en función de los requerimientos diferenciales de la diversidad de stocks y no solamente al de uno (generalmente el más abundante), con la consecuente posible extinción de los menos abundantes.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema principal radica en determinar el origen de los individuos que existen en el sitio de alimentación en las costas de Campeche, de acuerdo a la literatura estos podrían pertenecer a diferentes poblaciones radicadas en distintos países de la región, o de las que anidan en México. Las técnicas moleculares permiten detectar los orígenes por medio de la comparación con los genotipos característicos de las poblaciones estudiadas. En el caso de demostrar que co-ocurren diversas poblaciones, se podrá estimar por medio de análisis estadísticos la contribución relativa de los distintos stocks de la región para los cuales se conoce su composición haplotípica (Bass *et al.*, 1996; Bass, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 1999).

a. Hipótesis nula

- ✓ En los sitios de alimentación en la costa del Estado de Campeche ocurre un solo stock y este es el mismo que se observa anidando en las playas del país.

b. Hipótesis alterna

- ✓ En los sitios de alimentación existe una mezcla de stocks cuyos orígenes son diversas poblaciones de la región, diferenciadas genéticamente entre sí.

6. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Determinar la composición poblacional de la tortuga carey en el sitio de alimentación en frente de las costas del estado de Campeche.

b. Objetivos específicos

1. Desarrollar y validar nuevos cebadores para la amplificación de segmentos de la región control del ADNmit en tortugas carey más extensos de los que se han logrado a la fecha.
2. Secuenciar la región control del ADN mitocondrial de las tortugas carey que se encuentran en sitios de alimentación para identificar los haplotipos presentes.
3. Con base en la identidad y las frecuencias de haplotipos detectados, determinar la contribución porcentual de las poblaciones en la región a las agregaciones en sitios de alimentación
4. Discutir las implicaciones de los resultados para la conservación de la tortuga carey en el Caribe.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

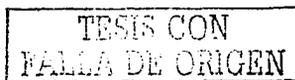
7. METODOLOGÍA

a. Muestreo y manejo de los organismos

La captura de tortugas y la extracción de tejido para este estudio fue realizada bajo la dirección del Biól. Vicente Guzmán, CRIP-Carmen responsable del proyecto de evaluación de Tortugas Marinas en Campeche de la Dirección General de Vida Silvestre (SEMARNAT) en Ciudad del Carmen Campeche.

Las tortugas se capturaron manualmente, se sigue la tortuga a velocidad media, hasta que se cansa o baje la velocidad, luego el buzo se sumerge para capturarla en el fondo. Normalmente se utilizan dos buzos, uno que se acerca a la tortuga por el frente para distraerla y el otro que la toma por detrás (Erhart & Ogren 1999, Guzmán-Hernández, 2001). Puede ser también que se lleve empujando a la tortuga hacia la costa. Si existen tortugas en el fondo descansando o durmiendo, a esas se les puede capturar fácilmente con un solo buzo (Guzmán-Hernández 2001). Para tortugas que se encuentren dentro de arrecifes y/o en cuevas pequeñas se pueden capturar colocando la red a la salida de las cuevas, lo que ocasiona que suban a la superficie para entonces ser capturadas (Guzmán-Hernández 2001).

Todas las tortugas fueron liberadas en la misma área de captura después de tomar muestra de sangre, sus datos biométricos y la información sobre ubicación del sitio usando GPS.



Durante todo el proceso se informó a la gente de la región y a los pescadores de las estrategias y planes de conservación de la tortuga. Se les entrevistó sobre cuando se han necho pescas accidentales para saber el lugar y el entorno de la captura, en las ocasiones cuando éstas fueron usadas para este estudio.

b. Preservación de las muestras

Se extrajo sangre del seno cervical de los individuos capturados, usando la técnica descrita por Owen y Ruiz (1980), y se preservaron en un buffer lítico de Sulfato de Dodecil de Sodio (SDS) conteniendo 100 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5 % SDS a un pH de 8.0. La proporción de sangre-amortiguador, se mantuvo en una relación de 1:10, de acuerdo a lo recomendado por White y Densmore (1992) (Apéndice A). Con este preservativo, las muestras pueden mantenerse bajo condiciones ambientales varias semanas sin deterioro del ADN.

Las muestras de sitios de alimentación para el presente trabajo se concentraron en la Delegación de Medio Ambiente de la SEMARNAP en Campeche, CRIP-Cármen y después se enviaron al Laboratorio de Genética de la Unidad Académica -Mazatlán (ICML) para almacenamiento a largo plazo y su análisis.

c. Tamaño y periodicidad de los muestreos

Se colectaron muestras de sangre para 171 individuos de las cuales para el estudio genético se analizaron 130. El Manual de Técnicas de Investigación y Manejo para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la Conservación de las Tortugas Marinas (Eckert *et al.* 1999) sugiere para este tipo de estudio 100 individuos.

Los sitios fueron elegidos de acuerdo al conocimiento de los pescadores sobre áreas de alimentación de las tortugas carey en la costa de Campeche y la facilidad logística para su muestreo. En el mapa de la **Figura 1** se indican los sitios de muestreo elegidos para el programa de captura.

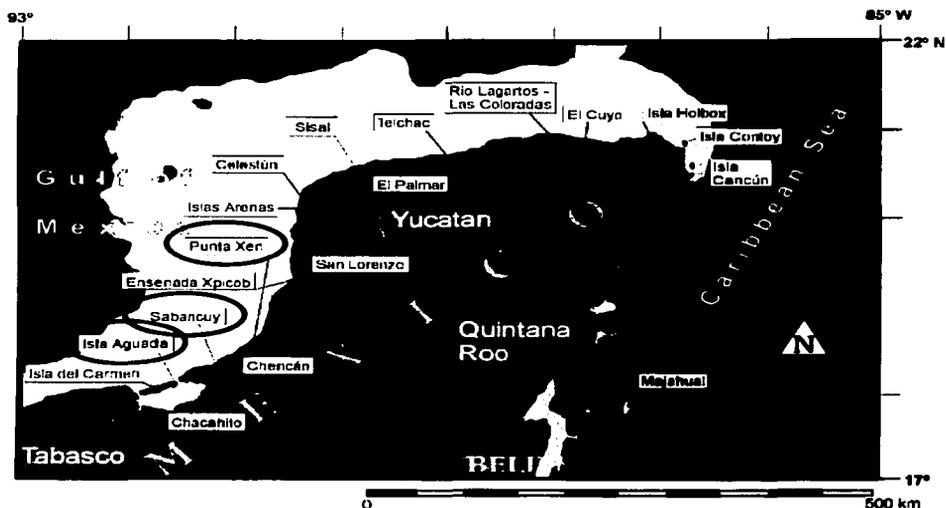


Figura 1. Sitios de muestreo en el Estado de Campeche (Guzmán.Hernández, 2001).

d. Destino de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron utilizadas para la obtención de ADN. Sin embargo, se mantendrán submuestras en la Colección de Tejidos del Laboratorio bajo criopreservación y se encontrarán disponibles para cualquier verificación o futuras investigaciones.

e. Extracción del ADN

El trabajo de laboratorio fué realizado en el Laboratorio de Genética de la Unidad Académica Mazatlán del ICMYL y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán. El ADN total se extrajo de las muestras por medio de dos técnicas: 1) la técnica de Cloruro de Sodio en solución saturada, seguido por precipitación con etanol y resuspendido en amortiguador Tris-EDTA, el detalle del protocolo se muestra en la **Tabla 7.1**; y 2) el método de extracción secuencial con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico seguido por precipitación en frío con alcohol etílico (Hillis-Moritz, 1990), el detalle del protocolo se muestra en la **Tabla 7.2**. Los productos del ADN se almacenaron en una solución Tris-EDTA 0.5 M amortiguada a un pH = 8.0 y una temperatura de – 20°C.

Para determinar la calidad (ausencia de proteína) del ADN extraído para cada una de las técnicas se utilizó el espectrofotómetro a varias longitudes de onda. La proteína absorbe primordialmente a 280 nm, mientras que el ADN a 260 nm. Para

detectar cual de los dos métodos de extracción resultaba en un ADN más limpio, se analizaron seis muestras distintas de ADN, tres de ellas extraídas con Cloruro de Sodio y tres con Fenol Cloroformo. Se considera puro un ADN (libre de proteínas) cuando su razón de absorbancia A_{260}/A_{280} es mayor de 1.5-1.7.

Extracción de ADN

Buffer de lisis (50ml) para trabajo en laboratorio:

5M NaCl 1 ml (concentración final 100 mM)
1M Tris pH 8 2.5 ml (concentración final 50 mM)
0.5M EDTA pH 8 10 ml (concentración final 100 mM)
20% SDS 2.5 ml (concentración final 1%)
Aforar a 50 ml con agua desionizada
Proteinasa K 20 mg/ml
NaCl solución saturada 6M
Etanol absoluto
TE

Protocolo:

1. Se toma una muestra de sangre de 200 μ l (sangre en buffer de lisis) y se afora a 400 μ l con el buffer de lisis para laboratorio (aproximadamente se le agrega 200 μ l del buffer de lisis).
2. Incubar el tejido con buffer de lisis y 20 μ l de proteinasa K a 37°C por 3 horas y media o toda la noche (12-16hrs.)
3. Añadir 200 μ l de NaCl saturado (6M) y agitar vigorosamente.
4. Incubar en hielo 10 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 rpm 10 minutos.
6. Transferir sobrenadante (500-600 μ l) a un tubo con 1 ml de etanol absoluto.
7. Invertir el tubo varias veces para precipitar el ADN. El ADN debe ser visible en etanol, en ese caso transferir el ADN a un tubo con 100 μ l de TE (si el ADN no es visible se recomienda centrifugar a 13,000 rpm 10 min y lavar con etanol 70%).
8. Correr gel de agarosa 0.7% con extractos crudos de ADN para verificar la extracción.

Tabla 7.1. Protocolo para la Extracción de ADN con la Técnica de Cloruro de Sodio en solución saturada.

Extracción de ADN fenol/cloroformo

1. Homogeneice aproximadamente 100 mg (un volumen de 0.5 ml) en 500 μ l de STE en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Añadir 75 μ l 20% SDS y mezcle ligeramente. Añada 25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml).
3. Mezcle bien e incube durante 2 horas a 55°C. Mezcle ocasionalmente durante la incubación para mantener suspendido el tejido.
4. Añada 700 μ l FCI, mezcle suavemente pero por completo e incube a temperatura ambiental durante 5 minutos.
5. Centrifugue por 5 minutos a 13,000 rpm.
6. Cuidadosamente remueva la fase acuosa con una pipeta de boca ancha. Transfiera a un nuevo tubo de 1.5 ml tratando de no transferir restos celulares ubicados en la interfase.
7. Re-extraer la fase acuosa con FCL y repetir desde el paso 4.
8. Añada 700 μ l de Cl, mezcle suavemente e incube por dos minutos. Invierta los tubos una vez cada minuto para evitar la separación de las fases.
9. Centrifugue por 3 minutos (13,000 rpm) y transfiera la fase acuosa a un tubo nuevo.
10. Re-extraer la fase acuosa con Cl y repetir desde el paso 8.
11. Añada 1/10 volúmenes (aproximadamente 50 μ l) de Acetato de Sodio (STE) 3M y 2.5X volumen de la muestra de etanol al 95% frío (-20°C) de 10 a 20 minutos. Agite bien invirtiendo los tubos varias veces para que se precipite el ADN. Es posible que se observe el ADN como hilos blancos.
12. Incube en un congelador durante por lo menos dos horas o toda la noche.
13. Centrifugue durante 10 minutos a 13,000 rpm. Preferiblemente bajo refrigeración. Se deberá observar un precipitado blanco en el fondo del tubo.
14. Enjuague el precipitado dos veces con 1 ml de etanol 70% frío a -20°C añadido cuidadosamente. Agite levemente, centrifugue durante 1 minuto a temperatura ambiental y decante el etanol.
15. Seque el precipitado en una centrifuga con vacío o volteando los tubos en gradilla a temperatura ambiental durante una hora para evaporar el etanol restante.
16. Resuspenda el precipitado en 250 μ l de 1X TE a 37°C, puede ser necesario incrementar la temperatura a 45-60°C si el ADN no se disuelve (en ocasiones es necesario dejar hasta 12 hrs a temperatura ambiente).
17. Verificar la calidad y cantidad de ADN usando 2 μ l de cada muestra en gel de agarosa al 1%.

Tabla 7.2. Protocolo para la Extracción de ADN con la técnica secuencial de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

f. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La técnica utilizada para la amplificación del ADNmit fue "la reacción en cadena de la polimerasa" (o PCR por sus siglas en inglés; Mullis y Faloona, 1987). La polimerasa es una enzima que realiza la síntesis del ADN a partir de un molde o hebra patrón de ADN preexistente, llamado cebador u oligo y nucleótidos trifosforilados. La nueva hebra obtenida es complementaria a la secuencia del ADN template. Debido al requerimiento de un grupo hidroxilo 3' libre, la reacción de la polimerasa solo se lleva a cabo en la dirección 5' a 3'.

En la amplificación, las muestras de ADN purificadas fueron utilizadas como template para producir copias de la región control o "D-loop" del ADN mitocondrial. El diseño de un cebador u oligo debe considerar su complementariedad a secuencias que flanqueen la región objeto de la amplificación. Los cebadores son secuencias de oligonucleótidos relativamente cortas, conteniendo 20-30 bases. Se amplificó la mayor parte de la región control ("D-loop") del ADN mitocondrial (ADNmit) utilizando cebadores diseñados en el laboratorio de genética del ICMYL (A.breu-Grobois in prep.) siguiendo el protocolo básico de Palumbi (1996) en volúmenes de 50 µl.

Se experimentó con cuatro diferentes parejas de cebadores como se muestra en la **Tabla 7.3**, esto debido a las dificultades que se tuvieron para la secuenciación en el equipo usado, a los cebadores se les modificó añadiéndoles la secuencia

estándar del fago M13 hasta encontrar que la pareja de cebadores LCM15382-M13R (Forward) y H950 (Reverse) daba una mejor secuencia.

Cebadores	
Izquierdo	Derecho
LTEi9	H950
LCM15382	H950
LCM15382-M13F	H950-M13R
LCM15382-M13R	H950

Tabla 7.3. Parejas de cebadores con los que se experimentó.

Estos cebadores fueron los utilizados:

LCM-15382-M13R

Fago M13: 5' GGATAACAATTTACACAGG ----- Cebador: GCTTAACCCTAAAGCATTGG 3'

H950

5' GTCTCGGATTAGGGGTTG 3'

A continuación se muestra el Protocolo utilizado para la PCR y las concentraciones utilizadas:

Paso	Segmento	Temp.(°C)	Tiempo (min)	Total Ciclos
1		95	5	1
2	A	95	0.5	35
	B	54	1	
	C	72	1	
3		72	5	1
4		4		FIN

Tabla 7.4. Protocolo de termociclado para la amplificación del ADNmit

Reactivos	Conc. trabajo	Unidades	Cantidad μ l por tubo
Agua	-	-	30.2
dNTPs	2.5	mM	3.4
MgCl ₂	25	mM	3
Primer F	10	μ M	2
Primer R	10	μ M	2
Buffer	10	X	5
Taq	5	unidad / μ l	0.4
DNA			4
TOTAL			50

Tabla 7.5. Mezcla de reactivos para PCR.

g. Purificación

Para limpiar los productos de las amplificaciones se utilizó la separación de productos en gel de agarosa al 2 % seguido por extracción con columnas MinElute (de QIAGEN, Inc) que permitieron las concentraciones más altas para la secuenciación y así eliminar las proteínas existentes, cebadores, encimas, sales y oligómeros así como el material utilizado para el gel: agarosa, bromuro de etidio y buffer de carga (dye). En la **Tabla 7.6** se muestra el protocolo de purificación que tuvo los mejores resultados.

Purificación directa con sistema Minelute Qiagen

1. Añadir al tubo de PCR 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen del producto PCR y agitar.
2. Preparar las columnas Minelute Qiagen.
3. Agregar las muestras a las columnas y centrifugar (centrifuga Heraeus Biofuge Primo R, Germany) un minuto.
4. Eliminar los lavados.
5. Agregar a cada tubo 750 μ l de buffer PE.
6. Incubar los tubos por cinco minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar por un minuto.
8. Eliminar los lavados.
9. Centrifugar los tubos por un minuto para eliminar todo el etanol.
10. Colocar las columnas Minelute en microtubos limpios de 1.5 ml.
11. Para eluir el ADN agregar directamente a la membrana 10 μ l de Agua Ultrapura 18 O a cada tubo.
12. Incubar los tubos un minuto a temperatura ambiente y centrifugar un minuto.
13. Correr gel de agarosa 2% por electroforesis (88 volts, 35 minutos), para verificar la presencia de la banda purificada

Tabla 7.6. Protocolo para la purificación de ADN amplificado por PCR.

h. Reacción de Secuenciación

Para este trabajo se secuenciaron los productos purificados de PCR en forma bidireccional en donde los cebadores son los marcados con los fluorocromos, la secuenciación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán, utilizando un secuenciador Li-COR modelo (Li-COR, Nebraska, USA), en el cual se realizan cuatro reacciones, cada una conteniendo el producto PCR que se va a secuenciar, los cebadores derecho e izquierdo (M13 en este caso) marcados con fluorocromos, la

ADN polimerasa para iniciar la síntesis de ADN, y cuatro terminadores didesoxibases (ddA, ddC, ddG y ddT).

Para realizar la reacción de secuenciación se utilizó el Sequencing kit- LC (Epicentre Technologies, USA) con la enzima Therm EXCEL II.

La mezcla maestra para cada muestra es la siguiente:

REACTIVO	1 X
Agua	2.4 μ l
oligo izq 1pmol μ l ⁻¹	0.75 μ l
oligo der 1pmol μ l ⁻¹	0.75 μ l
Buffer de secuenciación	3.6 μ l
Excell II ADN (enzima)	0.5 μ l
Total	9.0 μ l
ADN (prod. PCR)	2.0 μ l
Total por muestra	10 μl

Tabla 7.7. Mezcla maestra para la reacción de secuenciación.

1. Se agregaron 2 μ l de mezcla maestra en cuatro tubos etiquetándolos con A, C, G y T.
2. Se agregó 1 μ l de "termination mix" (A, C, G, T) a cada tubo correspondiente.
3. Se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones: dos minutos a 92°C, 30 ciclos de 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 54°C y un minuto a 72°C.
4. Al terminar el termociclado se agregaron 1.5 μ l de "stop solution" a cada tubo.
5. Se desnaturalizaron en el termociclador a 92°C por tres minutos.

Cuando las reacciones terminan, los productos de cada reacción se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5.5% con un espesor de 0.2 mm que produce una separación de alta resolución de cada fragmento de ADN generado. Cada uno de los fragmentos en las líneas termina con una base que corresponde al didesoxinucleótido usado en la reacción, se puede leer la secuencia de ADN en dirección 5' – 3'.

Cabe señalar que la secuencia del ADN mitocondrial de interés fue de mejor calidad utilizando solamente el oligo izquierdo M13, en el 70% de las secuencias obtenidas se utilizó solamente este oligo en cada uno de los canales de lectura de secuenciador, obteniéndose dos lecturas en sentido 5' – 3'.

La lectura y edición de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa e-Seq DNA Sequencing Software, Versión 1.0 (LI-COR, Inc. Nebraska, USA).

Además, para calibrar los resultados, se secuenciaron 30 muestras en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nueva York con el sistema ABI (BigDye Terminator versión 3.1) , utilizando un secuenciador ABI Prism 3700 DNA Analyzer o en un SpectruMedix 9610 Aurora DNA Sequencer.

Todas las secuencias fueron alineadas por medio del programa Genedoc (Nicholas, 2000), utilizando el algoritmo Blosum62 con los siguientes parámetros: ponderación por apertura de gap: 8, ponderación por extensión de gap: 4, para después

identificar los haplotipos presentes usando como referencias las secuencias para la tortuga carey de Bass *et al.* 1996 y Díaz-Fernández *et al.* 1999.

i. Análisis Estadístico

i. Prueba de χ^2

Con los datos de los haplotipos para cada sitio de muestreo se utiliza la prueba estadística de χ^2 para determinar si existen diferencias significativas entre sitios de muestreo, así identificar si existe dependencia entre ellos. El programa utilizado fue el CHIRXC (Zaykin y Pudovkin, 1993) que además simula la cadena de Monte Carlo para números pequeños de muestra. Esta permite evitar un error tipo I (aceptación de un falso negativo en términos de hipótesis nula).

ii. Análisis de Stocks

Este análisis se realiza para definir la contribución de colonias (sitios de nacimiento) de la tortuga carey en los sitios de alimentación. Se utilizó el Programa "Turtle" de Bolker *et al.* (en Prensa) que incluye un análisis de stocks mezclados con el método Bayesiano utilizando la Cadena Markov de Monte Carlo (MCMC), para estimar la contribución de haplotipos raros que solo se encuentran en pocas muestras de poblaciones fuente. Como posibles colonias fuentes en la región se utilizaron las composiciones genéticas de las colonias presentes en la Península de Yucatán y de la región (Abreu-Grobois *et al.*, 2003) reportadas en la literatura (Bass *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 1996) y utilizando la base de datos de secuencias de las

diferentes especies de tortugas marinas, generada a partir de los trabajos previos ya publicados (Abreu-Grobois *et al.*, 1996), toda esta información se compila en la **Tabla 7.8.**

iii. Relación entre características genéticas y Talla y Peso

En base a los datos que se tienen de talla y peso se hizo una correlación entre las características de los individuos encontrados y sus Haplotipos usando el programa NCSS versión 6.0.21 Jr (Hinter, 1996) para encontrar las Medidas de Tendencia Central y Dispersión además de hacer un Análisis de Varianza para así identificar si hay diferencias entre las medias de talla y peso para cada haplotipo encontrado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. RESULTADOS

a. Muestreo

Se recibieron un total de 171 muestras de sangre de tortuga carey tomadas en los cuatro sitios de alimentación (**Figura 1**): Campeche Norte (Punta Xen, Chenkan, y Sabancuy) y Campeche Sur (Puerto Real, Láguna de Términos). Sin embargo, por razones de tiempo y recursos se decidió enfocar el esfuerzo en un número de muestras representativo y que permitiera comparaciones entre sitios. Finalmente, tomando en cuenta las muestras que no amplificaron, el número total de muestras analizadas fueron 130 como se presenta en la **Tabla 8.1**.

AREA	Sitios de Alimentación	Total	Secuenciadas
Campeche Sur	Isla Aguada	80	42
	Punta Xen	48	48
Campeche Norte	Chenkan	11	11
	Sabancuy	32	29
	TOTAL	171	130

Tabla 8.1. Sitios de alimentación y el número de muestras recibidas y secuenciadas por sitio.

b. Extracción de ADN

Se hizo la extracción de 92 muestras con la técnica de Cloruro de Sodio citada anteriormente y 87 más se extrajeron con el método de Fenol Cloroformo, el resumen de las extracciones se encuentra en la siguiente tabla:

ESTACIÓN	Sitios de Alimentación	Fenol/Cloroformo	NaCl
Campeche Sur	Isla Aguada	0	42
Campeche Norte	Punta Xen	40	8
	Chenkan	11	0
	Sabancuy	29	0
	TOTAL	80	50

Tabla 8.2. Resumen del número de muestras extraídas mediante cada una de las técnicas de extracción de ADN por sitio de muestreo.

Con ayuda del espectrofotómetro se observó que ambos métodos de extracción permitieron una calidad óptima (valor de $A_{260}/A_{280} > 1.5-1.7$); los resultados se muestran en la **Tabla 8.3**.

Técnica	Muestra	Dilución	A260 (DNA)	A280	A280 (Prot.) neta	A260/A280
NaCl	Ei609	0.1	0.534	0.789	0.289	1.8478
NaCl	Ei591	0.1	0.36	0.687	0.187	1.9251
NaCl	Ei608	0.1	0.799	0.907	0.407	1.9631
Fenol-Clor	Ei559	0.1	0.782	0.884	0.384	2.0365
Fenol-Clor	Ei562	0.1	0.378	0.683	0.183	2.0656
Fenol-Clor	Ei567	0.1	0.793	0.894	0.394	2.0127

Tabla 8.3. Determinación de la calidad de ADN de acuerdo absorbancia, todos los datos están arriba del valor estándar de pureza (1.5-1.7).

c. Diseño de cebadores y PCR

Uno de los primeros objetivos de esta investigación fue el diseñar nuevos cebadores que permitieran no solo incrementar la porción del segmento de la región control a amplificar sino que fueran consistentes en las reacciones de

PCR. Después de varios intentos, los cebadores que mejor resultado dieron fueron LCM15382-M13R (izquierdo) y H950 (derecho) citados anteriormente.

Los productos de PCR, fueron sometidos a un proceso de electroforesis en geles de agarosa al 2% para verificar que la amplificación se llevara a cabo sobre el segmento de interés. Tal como se observa en la **Figura 8.1** se obtuvieron amplificaciones exitosas (bandas y en el tamaño esperado) para la región de interés.

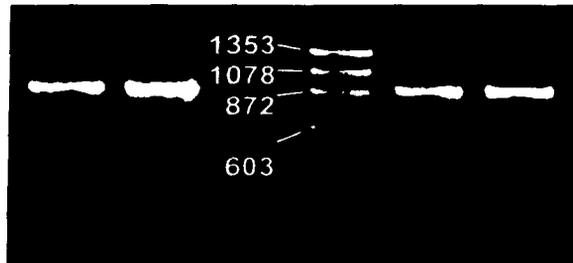


Figura 8.1. Amplificación de segmento de aprox. 880 bases que pertenece a la región control del ADN mitocondrial, se señalan el número de bases en el marcador molecular utilizado.

d. Purificación de ADN

Después de algunas reacciones de PCR se observó la amplificación de una pequeña banda adicional por lo cual se decidió aplicar la purificación mediante corte de gel de agarosa, extrayendo exclusivamente la banda principal. Para este tipo de purificación se aplicaron dos protocolos uno eluyendo el ADN a 25 μ l (QIAquick Spin columns) y el otro eluyendo a 10 μ l (Qiagen MinElute), para

obtener una mayor concentración de ADN. Debido a que las mayores concentraciones proporcionaron mejores secuenciaciones se optó por purificar exclusivamente con el sistema MinElute Qiagen.

Se experimentó también con la aplicación del sistema de Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de Camarón para la obtención de un ADN más limpio. Sin embargo dicho sistema no funcionó y se descartó.

Debido a la importancia que tiene la purificación en la secuencia a continuación se detallan los resultados:

Tipo de Purificación	No. Muestras
Columna Q	32
Corte	5
Exo y Fosf.	5
Promega	2
Minelute sin Corte	2
Corte Minelute	65
TOTAL	111

Tabla 8.4 Ensayos de purificación de productos de PCR, la mejor secuencia de ADN mitocondrial se obtuvo a partir de la purificación con corte de gel, utilizando el sistema MinElute (Qiagen Inc), el detalle del protocolo se muestra en el APÉNDICE D.

Para identificar la cantidad de ADN obtenido fue necesario recurrir a diversas técnicas para medir la concentración del producto PCR purificado: la primera fue

con un **Fotodocumentador**, el cual a partir de la cantidad cargada en un gel de agarosa y la concentración de un marcador de peso molecular específico se compara la **intensidad de fluorescencia** de bromuro de etidio con el resto de las bandas. También se utilizó el **Fluorómetro** que mide la concentración del ADN comparando su fluorescencia con la de un estándar.

De acuerdo a las mediciones realizadas por estos dos métodos se observó que la gama de concentración de ADN encontrado en las diversas muestras fue de 5 $\mu\text{g/ml}$ a un máximo de 100 $\mu\text{g/ml}$, y a esta última concentración máxima fue con la cual se obtuvo mejor calidad de secuenciación. La calidad y cantidad de ADN determina significativamente la calidad en la secuencia como se verá en la siguiente sección.

e. Secuenciación

El objetivo medular de este trabajo fue lograr secuencias de calidad de manera consistente. Cabe recalcar que en el laboratorio es la primera vez que de lleno se involucra en la parte de secuenciación ya que antes este trabajo se mandaba a laboratorios externos. La secuenciación se llevó a cabo en el laboratorio de **Biología Molecular del CIAD Mazatlán**, gracias a las facilidades gentilmente proporcionadas.

Se realizaron secuenciaciones para maximizar el número de bases obtenidas. En un principio no se obtenían secuencias de buena calidad al parecer por la poca cantidad de ADN.

En la **Figura 8.2** se muestran del lado derecho la lectura del secuenciador (en dirección 5' a 3' de abajo para arriba) las primeras secuenciaciones directas de muestras de Carey purificadas con el sistema Qiagen mientras que en el lado izquierdo se muestra una secuenciación de genes clonados en el vector pGEM-T (CIAD, lab. Biología Molecular), se observa la diferencia en la intensidad de las bandas:



Figura 8.2. Vista gel de secuenciación, izq. genes clonados del vector pGEM-T, der. secuenciación directa de productos PCR de región control en Carey.

Debido a las dificultades encontradas con secuenciaciones directas, con los mismos cebadores marcados, se decidió clonar un par de muestras para obtener la secuencia completa con técnicas ya optimizadas para este protocolo. Dicha técnica se llevó a cabo también en el laboratorio de Biología Molecular en el CIAD Unidad Mazatlán.

La técnica de clonación se basa en ligar a un plásmido la secuencia deseada para después secuenciar la región de interés con cebadores específicos para las secuencias de los promotores virales que contenga dicho plásmido. El plásmido

es recreado por bacterias que lo reproducen con el inserto deseado. En el APÉNDICE E se detalla el protocolo de la clonación.

Con este procedimiento fue posible obtener una secuencia completa de la región control y una porción de los tRNA en su extremo 5' a partir de los productos de PCR de dos muestras de Isla Aguada al Sur de Campeche. A continuación se muestran las secuencias obtenidas:

Muestra 1:

5'

```
CCTCCCCTGGCCGGACGATTGGGAAATCAAAAAGCAAACCTTCATCCCCTGGCCCCAAAACCGGA
ATCTTTTAATTAACATATCCCTTGACGCAGAATAAGCGCCACACATAAACTTACCTATATCCTCTAC
CGTGCCCGAGCAGACCAATATCCGCAACACTTACCTATGTATTATTGTACATCTACTTATTTACCACTA
GCATATGACCCGGTAGTACTGCTGATTAATCTGACCTAAAACATAAAATTATTGGTTTCACATAAACTG
TTTAAACTACATGACTATTATACAGSTAATAAGAATGAAATGGTATAGGACATAATATTAAGTAATTAT
TCTCAAACATGAATATTGTCACAGTAATGGGTTATTTCTTAGTTTCAGCTCATCACGAGAAATAAGCAA
CCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAGGCCCATTAATTTATGGCGTACATAACTGATCTA
TTCTGGCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATCGAATTGGTAAAGTTCATTCATCTCTTTTTAAAGGC
CTCTGGTTAAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAAGGTGGTTTTACTTGCATATAGTA
GTCTTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAAAGTATACCTGCCGAATTAATGAAACTGAACC
TACGTTTAAAGATGATTGGTCGTGCAAGATAATCAATGGTATTATTTAATTAATGCTTGAAGACATATA
TTCTTATAAAAACACAAACAGTTACGCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCCCCAC
CCCCTAACCATATGCCGATACTATTTCTTTTGCAACCTAACCGAAACTTGATCCGCGGGCCGGGC
```

3'

Tabla 8.5. Primer secuencia obtenida a partir de la clonación, corresponde al haplotipo EIA023.

Muestra 2:

5'

```
AATCAAAAAGGACCAAACTTCATCCCGGGCCCCAAAACCGGAATCTTTAATAAACTATC
CCTTGACGCAGAAATAAGCGCCAACACATAAACTTACCTATATCCTCTACCGTGCCCGAGACCA
ATATCCGCAACACTTACCTATGTATTATTGTACATCTACTTTTACCAGTATGACCGGTAG
TACTGCTGATTAATCTGACCTAAAACATAAAATTATTGGTTTCACATAAACTGTTAAACTACATGA
CTATTATACAGGTAATAAGAATGAAATGGTATAGGACATAATATTAAGTAATTATTCTCAACATGA
ATATTGTCACAGTAATGGGTTATTTCTTAGTTTCAGCTCATACGAGAAATAAGCAACCCTTGTTAGT
AAGATACAACATTACCAGTTTCAGGCCCATTAATTTATGGCGTACATAACTGATCTATTCTGGCCT
CTGGTTGTTTTTCAGGCACATCGAATTGGTAAAGTTCATTCTCTTTTTAAAAGGCCTCTGGTT
AAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAAGGTGGTTTTACTTGATATAGTAGTCTTT
TTTTTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAACTGATACCTGCCGAATTAATGAAACTGAACCTACG
TTTAAGATGATTGGTCGTGCAAGATAATCAATGGTATTATTTAATTAATGCTTGAAAGACATATATT
CTTATAAAAACACAAAGTTATTACAGCCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCC
CCACCCCATAACTAACATCATGCCGATACTATTACTTTTTGCACCATGGACCCTAGTGATTG
GGCCGTGAGTGTTGGTTTT
```

3'

Tabla 8.6. Muestra secuenciada a partir de la clonación, corresponde al Haplotipo EiA001.

En dichas secuencias se encontraron dos haplotipos distintos que corresponden a los haplotipos EiA023 y EiA001 de acuerdo a la clasificación de Abreu (sin publicar). A pesar del éxito por medio de clonación, sería demasiado tardado y costoso para su aplicación al número de muestras de este proyecto.

Después de haber amplificado con los nuevos cebadores: LCM-15382 M13 y H950 se logró estandarizar la reacción de secuenciación para el resto de las muestras y se obtuvieron secuencias de hasta 800 bases tal como de la clonación.

A continuación se muestra la alineación de 5 muestras representativas de los 5 haplotipos encontrados en este trabajo, están definidas por el número de PCR y

catálogo que se manejó en este trabajo, además de sitio de muestreo donde fue obtenida la muestra (en el Anexo 1 y 2 se observa la designación y descripción para cada uno de los individuos analizados), la letra X al inicio de las secuencias indica el inicio de la región control de ADN mitocondrial:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

>EiA039_3087_Ei595_Isla_Aguada .
CCGGAATCTTTTAACTAACTATCCCTTGXACGCAGAATAAGCGCCAACACATAAACTTA
CCTATATCCTCTACCGTGCCAGCAGACCAATATCCGCAACACTTACCTATGTATTATTG
TACATCTACTTATTTACCAGTAGCATATGACCGGTAGTATTGCTGATTAATCTGACCTAA
AACATAAAAATTATTGGTTTCACATAAACTGTTTAACTACATGACTATTATACAGGTAAT
AAGAATGAAATGGTATAGGACATAAATTAAGTAATTAATTCTCAAACATGAATATTGTCA
CAGTAATGGGTTATTTCTTAGTTACAGCTCATCAGCAGAAAATAAGCAACCCCTGTTAGTAA
GATACAACATTACCAGTTTCAGGCCATTAAATTTATGGCGTACATAAAGTATCTATTCTG
GCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATCGAATTGGTAAAGTTCATTATCTCTTTTTAAAA
GGCCTCTGGTAAATGAGTTCTATACATTAATTTATAAAGTGGCATAAAGGTTGGTTTTAC
TTGCATATAGTAGTCTTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAAAGTATACCTGC
CGAATTAATGAACTGAACCTACGTTAAAGATGATTGGTCTGCAAGATAATCAATGGTA
TTATTTAATTAATGCTTGAAGACATATATTCTTATAAAAACTCACAACAGTTATTTACA
AGCCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCCCCCCACCCCATAACTAACAT
CATG

>EiA023_3089_Ei597_Isla_Aguada .
CCGGAATCTTTTAACTAACTATCCCTTGXACGCAGAATAAGCGCCAACACATAAACTTA
CCTATATCCTCTACCGTGCCAGCAGACCAATATCCGCAACACTTACCTATGTATTATTG
TACATCTACTTATTTACCAGTAGCATATGACCGGTAGTACTGCTGATTAATCTGACCTAA
AACATAAAAATTATTGGTTTCACATAAACTGTTTAACTACATGACTATTATACAGGTAAT
AAGAATGAAATGGTATAGGACATAAATTAAGTAATTAATTCTCAAACATGAATATTGTCA
CAGTAATGGGTTATTTCTTAGTTACAGCTCATCAGCAGAAAATAAGCAACCCCTGTTAGTAA
GATACAACATTACCAGTTTCAGGCCATTAAATTTATGGCGTACATAAAGTATACCTGC
GCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATCGAATTGGTAAAGTTCATTATCTCTTTTTAAAA
GGCCTCTGGTAAATGAGTTCTATACATTAATTTATAAAGTGGCATAAAGGTTGGTTTTAC
TTGCATATAGTAGTCTTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAAAGTATACCTGC
CGAATTAATGAACTGAACCTACGTTAAAGATGATTGGTCTGCAAGATAATCAATGGTA
TTATTTAATTAATGCTTGAAGACATATATTCTTATAAAAACTCACAACAGTTATTTACA
AGCCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCCCCCCACCCCATAACTAACAT
CATG

>EiA024_3192_Ei704_Sabancuy .
CCGGAATCTTTTAACTAACTATCCCTTGXACGCAGAATAAGCGCCAACACATAAACTTA
CCTATATCCTCTACCGTGCCAGCAGACCAATATCCGCAACACTTACCTATGTATTATTG
TAcATcTACTTATTTACCAGTAGCATATGACCGGTAGTACTGCTGATTAATCTGACCTAA
AACATAAAAATTATTGGTTTCACATAAACTGTTTAACTACATGACTATTATACAGGTAAT
AAGaTGAaATGGTATAGGACATAAATTAAGTAATTAATTCTCAAACATGAATATTGTCA
CAGTAATGGGTTATTTCTTAGTTACAGCTCATCAGCAGAAAATAAGCAACCCCTGTTAGTAA
GATACAACATTACCAGTTTCAGGCCATTAAATTTATGGCGTACATAAAGTATCTATTCTG
GCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATCGAATTGGTAAAGTTCATTATCTCTTTTTAAAA
GGCCTCTGGTAAATGAGTTCTATACATTAATTTATAAAGTGGCATAAAGGTTGGTTTTAC
TTGCATATAGTAGTCTTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAAAGTATACCTGC
CGaATTAATGAACTGAACCTACGTTAAAGaTgaTTGGTCTGCAAGaTAATcAATGGTA
TtaTTTaaTTAATGcTTgAAAGACATATATTCTTATAAAAACTCACAACAGTTATTTACA
AGCCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCCCCCCACCCCATAACTAACAT
CATG

>EiA022_3148_Ei652_Punta_Xen .
CCGGAATCTTTTAACTAACTATCCCTTGXACGCAGAATAAGCGCCAACACATAAACTTA
CCTATATCCTCTACCGTGCCAGCAGACCAATATCCGCAACACTTACCTATGTATTATTG
TACATCTACTTATTTACCAGTAGCATATGACCGGTAGTACTGCTGATTAATCTGACCTAA
AACATAAAAATTATTGGTTTCACATAAACTGTTTAAAGTACATGACTATTATACAGGTAAT
AAGAATGAAATGGTATAGGACATAAATTAAGTAATTAATTCTCAAACATGAATATTGTCA
CAGTAATGGGTTATTTCTTAGTTACAGCTCATCAGCAGAAAATAAGCAACCCCTGTTAGTAA
GATACAACATTACCAGTTTCAGGCCATTAAATTTATGGCGTACATAAAGTATCTATTCTG

GCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATCGAATTGGTAAAGTTCATTTCATCTCTTTTTAAAA
GGCCTCTGGTTAAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAAGGTGGTTTTAC
TTGCATATAGTAGTCTTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAAAGTATACCTGC
CGAATTAATGAACTGAACCTACGTTTAAAGATGATTGGTCGTGCAAGATAATCAATGGTA
TTATTTAATTAATGCTTGAAAGACATATATTCTTATAAAAACTCACAACAGTTATTTACA
AGCCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCCACCACCCACAACTAACAT
CATG

>EiA001_3306_Ei671_Punta Xen .

CCGGAATCTtTTAATTAACCTATCCCTTGXACGCAGAATAAGCGCCAACACATAAACTTA
CCTATATCCTCTACCGTGCCAGCAGACCAATATCCGCAACACTTACCTATgTACTATTG
TACATCTACTTATTTACCACTAGCATATGACCAGTAGTACTGGTGATTAACTGACCTAA
AACATAAAATTAATgTTTTACATAAACTGTTTAAACTACATGACTATTATACAGGTAAT
AAGaATGAAATGGTATAGGACATAATATTAAGtAATTATCTCAAAACATGAATATCGTCA
CAGTAATGGGTATTCTTAGTTCAGCTCATCACGAGAAATAAGCAATCCTTGTTAGTAA
GATACAACATTACCAGTTTCAGGCCCaTTAATTATGGCGTACATAAAGTATCTATTCTG
GCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATGAATTgGTAAAGtTCATTCATCTCTtTTAAGA
GGCCTCTGGTTAAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTgGcATAAgGTGGTtTTAC
TTgCATATAGTAGTCTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCCaCATAACTgATaCCTGC
GgaATTAATGAACTGaACCTACGTTTAAAGAtGATTGGTCGTGCAAGATAATCAATGGTA
TTATTTAATTaaTGCTTGAAGACATaTaTTCTTATAAAAACTCACAACAGTTATTTACA
AGCCTAACCTATTACAACATACTTTTTAGTTAAACCCCCACCACCCACATAAACTAACAT
CATG

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

f. Composición haplotípica en sitios de alimentación

Se obtuvieron 130 secuencias con 800 bases en promedio. Se encontraron 5 haplotipos de los ya registrados en la literatura, en la **Tabla 8.7** se enumeran las secuencias de acuerdo al haplotipo.

HAPLOTIPO	No. DE MUESTRAS	Frecuencia
EiA001	3	2%
EiA022	2	2%
EiA023	97	75%
EiA024	2	2%
EiA039	26	20%
TOTAL	130	100%

Tabla 8.7. Número de secuencias en función de los haplotipos encontrados.

Debido a que existen clasificaciones diferentes de los haplotipos de la región control de la tortuga Carey, correspondiendo a los trabajos de Bass *et al.* (1996) y de Díaz-Fernández *et al.* (1999) así como una reciente clasificación global de Abreu-Grobois (com. pers.) se muestra la correspondencia en la siguiente tabla (**Tabla 8.8**). En las figuras se utiliza la nomenclatura de Díaz-Fernández *et al.* (1999) para facilitar la asociación con sitios de origen.

HAPLOTIPO	Díaz-Fernández <i>et al.</i> (1999)	Bass (1996)
EiA001	CU1	A
EiA022	MX3	P
EiA023	MX1	Q
EiA024	MX2	Q
EiA039	q	no reconocido

Tabla 8.8. Clasificación de haplotipos de acuerdo a Bass *et al.*, (1996) y Díaz-Fernández *et al.*, (1999) y su correlación con los definidos en este trabajo.

La diferencia entre la clasificación de Bass *et al.* (1996) y Díaz-Fernández *et al.* (1999) se debe a que Bass *et al.* (1996) trabajó con amplificaciones de 384 pares de bases mientras que Díaz-Fernández *et al.* (1999) trabajó con 480 pares de bases encontrando 28 sitios polimórficos, tres más de lo que habían encontrado Bass *et al.* (1996).

Las Frecuencias absolutas de los haplotipos encontrados en este trabajo se muestran en la **Tabla 8.9**. Obsérvese que los haplotipos más abundantes son los característicos de México. Hay un 74.6% de individuos identificados con el haplotipo MX1 o EiA023. En segundo lugar con el 20%, se encontró el haplotipo "q" o EiA039 también de origen mexicano y de forma significativa se encontró con un 2.3% de contribución un haplotipo EiA001 con posible origen en Cuba u otras colonias del Caribe, aunque también se ha encontrado en muy bajas proporciones en la colonia anidadora de Isla Aguada. (Abreu-Grobois *et al.*, 2003).

HAPLOTIPO	Isla Aguada N=12	San Juan N=13	Chenker N=11	San Juan N=10	TOTAL	FRECUENCIA
EiA001=CU1	0	3	0	0	3	2.3%
EiA022=MX3	0	2	0	0	2	1.5%
EiA023=MX1	32	31	10	24	97	74.6%
EiA024=MX2	1	0	0	1	2	1.5%
EiA039=q	9	12	1	4	26	20.0%
	42	48	11	29	130	100.0%

Tabla 8.9. Clasificación de Haplotipos en función de sitio muestreo. Cada columna corresponde a un sitio de muestreo, cada fila corresponde al número de individuos caracterizados por cada haplotipo, se muestra la diferente clasificación de haplotipos en la primera columna y en la última se observan las Frecuencias absolutas en %. N representa el número de secuencias analizadas por sitio.

i. Comparación de composición entre sitios

Para verificar si existe entre los sitios muestreados una diferencia significativa con respecto a la composición haplotípica se obtuvo un valor de χ^2 en la prueba de RxC de 13.497 ($\chi^2_{\text{crítica}} = 21.026$, $n=4$ y $\alpha = 0.05$) por lo tanto las diferencias no se consideran significativas ($\chi^2 < \chi^2_{\text{crítica}}$), y por ende los datos para todos los sitios muestreados al considerarse una misma población fueron combinados. En la **Tabla 8.10** se muestran los resultados. Además se hizo la prueba de χ^2 en comparaciones pareadas para todos los sitios de muestreo y se corroboró con la prueba de χ^2 general. En cada uno de los resultados se observa que no hay diferencia significativa entre sitios con nivel de significancia del 95%, se puede considerar entonces que la distribución de haplotipos en cada uno de los sitios de muestreo no es diferente ($P < 0.05$ con 3 grados de libertad para todos los casos).

SITIOS	χ^2	$\chi^2_{\text{crítica}}$	Significativa
Isla Aguada vs Punta Xen	6.071	9.488	No
Isla Aguada vs Chenkan	1.203	5.991	No
Isla Aguada vs Sabancuy	0.709	5.991	No
Punta Xen vs Chenkan	3.066	7.815	No
Punta Xen vs Sabancuy	6.604	9.488	No
Chenkan vs Sabancuy	0.582	5.991	No
Todos vs Todos	13.497	21.026	No

Tabla 8.10 Prueba de χ^2 para composiciones haplotípicas entre los sitios de muestreo. Por lo tanto cada uno de los sitios muestreados se considera una misma población con un $\alpha = 0.05$ y g.l. = 3.

ii. Correlación Talla y Peso vs Haplotipos.

Para el análisis descriptivo con respecto a talla y peso se hizo una tabla de frecuencias con ayuda del paquete NCSS versión 6.0.21 Jr (Hinter, 1996). Los

resultados se muestran en la **Tabla 8.11**. Se observa que el 76% de los individuos son menores a 45 cm. También se encontraron individuos de talla grande: más de 55 cm pero en tan solo el 5%.

Talla	Cuenta	Acumulada Cuenta	%	Acumulada %
Menos de 25	4	4	3.1	3.1
25 To 30	23	27	17.8	20.9
30 To 35	25	52	19.4	40.3
35 To 40	27	79	20.9	61.2
40 To 45	20	99	15.5	76.7
45 To 50	14	113	10.9	87.6
50 To 55	8	121	6.2	93.8
55 To 60	5	126	3.9	97.7
60 To 65	1	127	0.8	98.5
Mas de 65	2	129	1.6	100.0

Tabla 8.11. Tabla de Frecuencias para la talla, donde la talla está descrita en cm.

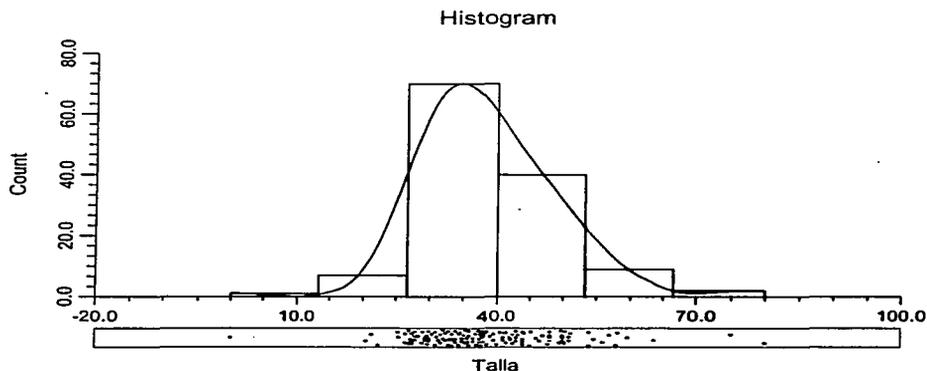


Figura 8.3. Histograma de frecuencias para la talla.

En la **Figura 8.3** se muestra un histograma-para la distribución de frecuencias, se llevó a cabo la prueba de normalidad y homocedasticidad al ser rechazada fue necesario

utilizar la prueba de Kruskal-Wallis (Siegel, 1978) para el análisis de varianza. Se obtuvieron las medidas de resumen para la talla que permiten ver la varianza y la desviación estándar de los datos (Tabla 8.12).

N	Media	Desviación Estándar	Rango	Mediana	Moda	Varianza	Coeff. de Variación	Kurtosis
130	38.796	10.6605	80	37.45		113.6463	0.2747	5.4297

Tabla 8.12. Resumen de estadística descriptiva para la talla en centímetros midiéndose la longitud de carapacho, N representa el número de la muestra, la Kurtosis mide la variación a la normalidad y el Coeficiente de variación da una estimación de cuánto se despegan los datos de la media.

Se observa que existe una variación mínima entre la Media y la Mediana, la media de la talla para estos individuos es de 38.8 cm de LCC. Existe una variabilidad del 27% de los datos con respecto a la media de acuerdo al coeficiente de variación.

Agrupando en función de haplotipo, se obtuvieron los resultados de la Tabla 8.13:

Haplotipo	N	Media	Moda	Mediana	Rango	Desviación Estándar	Varianza	Coeff. de Variación	Kurtosis
EiA001	3	42.1	38	38.2	12	6.871	47.213	0.163	
EiA002	2	41.3	34.5	41.25	13.5	9.545	91.125	0.231	
EiA023	97	38.2		36	80	11.346	128.745	0.296	5.588
EiA024	2	30.8	29.8	30.8	2	1.414	2	0.045	
EiA039	26	41.0		40.5	30.7	8.430	71.080	0.205	2.222

Tabla 8.13. Resumen de medidas de dispersión y tendencia central para los datos de talla (cm LCC) agrupándolos en función del haplotipo encontrado N=número de datos, la Kurtosis mide la variación a la normalidad y el Coeficiente de variación da una estimación de cuánto se despegan los datos de la media.

Los individuos más grandes pertenecen al Haplotipo EiA001, a pesar de que fueron pocos los individuos que se encontraron en este sitio de alimentación pareciera que son de los individuos más grandes.

A continuación se observan los resultados obtenidos con una gráfica de cajas, los puntos azules muestran que existen valores extremos en los datos (Figura 8.4) de tamaño para los individuos tipificados con el Haplotipo EIA023 pero en general para el resto de los haplotipos se tienen los mismos márgenes y valores de la media.

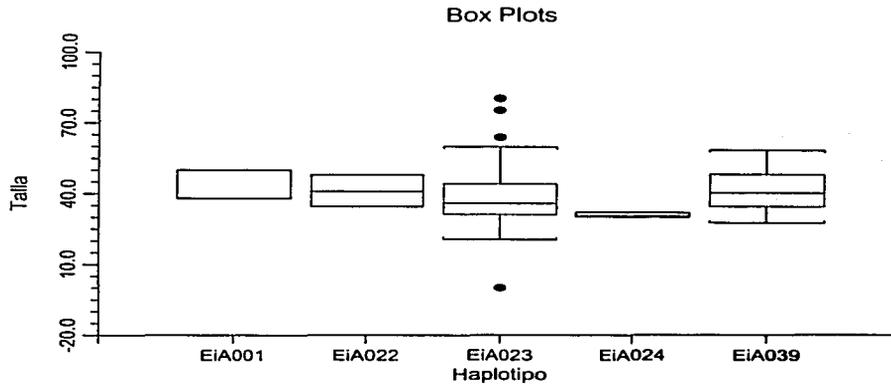


Figura 8.4. Distribución de la Talla de acuerdo al Haplotipo. Los puntos azules indican valores extremos, los tallos indican los límites superior e inferior de la desviación estándar, la media se muestra como la línea roja en medio de la caja y los límites de la caja representan el error estándar.

Con el análisis de Kruskal-Wallis para la talla, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de las tallas agrupándolas de acuerdo a los 5 distintos haplotipos que se encontraron ($H= 5.748116$, $p=0.2187$, $g.l.=4$).

Además de la talla se hará el mismo estudio para el peso expresado en Kg para cada uno de los individuos tipificados, la tabla de frecuencias obtenida para el peso se muestra en el **Tabla 8.14**.

Peso	N	Acumulado	%	% Acumulado
Menos de 1	5	5	3.9	3.9
1 To 3	29	34	22.3	26.2
3 To 5	29	63	22.3	48.5
5 To 7	19	82	14.6	63.1
7 To 9	14	96	10.8	73.9
9 To 11	9	105	6.9	80.8
11 To 13	11	116	8.5	89.2
13 To 15	4	120	3.1	92.3
15 To 17	3	123	2.3	94.6
17 To 19	2	125	1.5	96.2
21 To 23	3	128	2.3	98.5
Mas de 25	2	130	1.5	100.0

Tabla 8.14. Distribución de Frecuencias para el peso en Kg. N representa el número de muestras en dicho intervalo, en las últimas columnas se muestra el %, y el % acumulado.

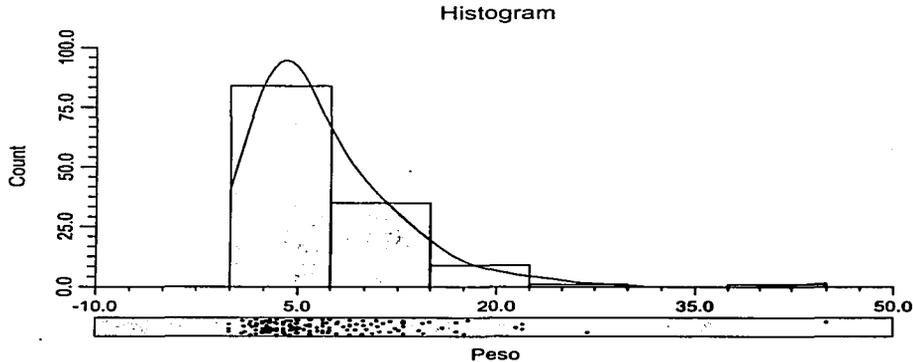


Figura 8.5. Histograma de Frecuencias para el Peso en Kg.

Se hizo la prueba de normalidad y fue rechazada para los valores de peso, se observa en la **Figura 8.5** que no se tiene una distribución normal, por lo cual se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis para verificar si hay diferencia entre las medias de los pesos agrupando los datos de acuerdo a los 5 haplotipos encontrados.

Se presentan las medidas de Tendencia Central y de Dispersión para todos los datos de peso **Tabla 8.15** y agrupándolos en función de los haplotipos en la **Tabla 8.16**.

N	Media	Moda	Mediana	Rango	Desviación:		Coeficiente	
					Estándar	Varianza	de Dispersión	Kurtosis
130	7.141	3	5.15	45	6.1018	37.23252	0.7901	13.8210

Tabla 8.15. Medidas de Dispersión y Tendencia Central para el Peso en Kg, N=número de datos, la Kurtosis mide la variación a la normalidad y el Coeficiente de variación da una estimación de cuánto se despegan los datos de la media.

Se observa que hay una diferencia considerable entre la Media y la Mediana por lo tanto la Mediana nos va a dar una mejor descripción del promedio de los datos, la mayoría de las tortugas son pequeñas y en promedio pesan 5.15 kg, aunque debe de haber suficientes datos extremos para que la Media se calcule como 7.141 Kg. Se puede pensar que hay suficientes individuos de peso alto. Por lo tanto se lleva a cabo el mismo análisis agrupando de acuerdo a los haplotipos.

Haplotipo	N	Media	Moda	Mediana	Rango	Desviación:		Coeficiente	
						Estándar	Varianza	de Dispersión	Kurtosis
EiA001	3	7.66	5	6	7	3.785	14.333	0.388	
EiA022	2	6.75	4.5	6.75	4.5	3.181	10.125	0.333	
EiA023	97	6.97	3.5	5	45	6.510	42.380	0.830	14.238
EiA024	2	3.17	3	3.175	0.35	0.247	0.061	0.077	
EiA039	26	8.05	4	7.15	19.87	5.053	25.539	0.627	3.517

Tabla 8.16. Medidas de Dispersión y Tendencia Central para el Peso en Kg agrupadas en función de Haplotipo N=Número de datos, la Kurtosis mide la variación a la normalidad y el Coeficiente de variación da una estimación de cuánto se despegan los datos de la media.

Los Haplotipos EiA039 y EiA001 muestran a los individuos de mayor peso (**Tabla 8.16**). Para el Haplotipo EiA023 debido al número de datos se muestra una dispersión más grande, existen datos extremos que afectan el promedio dado el rango de 45, es por

eso la diferencia entre la Media y la Mediana. Sin embargo se puede demostrar que no hay diferencias significativas con el análisis de Kruskal-Wallis para el peso agrupándolas de acuerdo al haplotipo ($H=4.3648$, $p=0.3589$, $g.l.=4$). Se pueden corroborar los datos con la gráfica de cajas en la **Figura 8.6**.

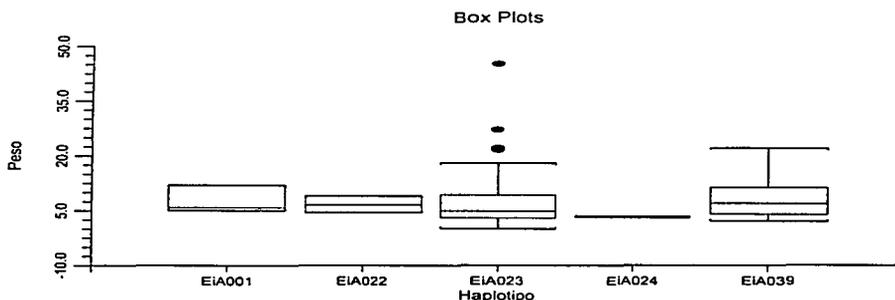


Figura 8.6. Distribución de Peso en Kg en función de los Haplotipos encontrados. Los puntos azules indican valores extremos, los tallos indican los límites superior e inferior de la desviación estándar, la media se muestra como la línea roja en medio de la caja y los límites de la caja representan el error estándar.

A manera de ejercicio se realizaron las gráficas de cajas pero en función de los sitios de muestreo, para observar si hay alguna variante en cuánto a talla y/o peso. Observar las **Figura 8.7** y **Figura 8.8**.

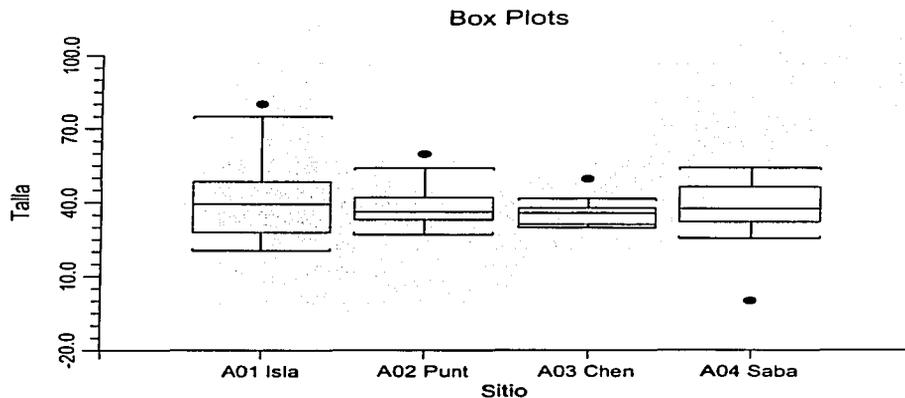


Figura 8.7. Gráfica de cajas de acuerdo a la Talla en función de los sitios de muestreo. Los puntos azules indican valores extremos, los tallos indican los límites superior e inferior de la desviación estándar, la media se muestra como la línea roja en medio de la caja y los límites de la caja representan el error estándar.

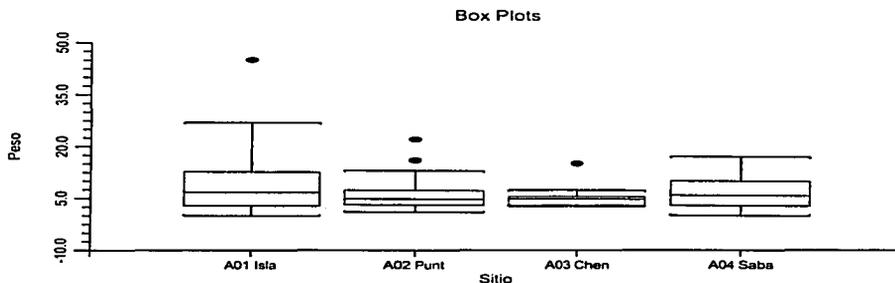


Figura 8.8. Gráfica de cajas de acuerdo al Peso en función de los sitios de muestreo. Los puntos azules indican valores extremos, los tallos indican los límites superior e inferior de la desviación estándar, la media se muestra como la línea roja en medio de la caja y los límites de la caja representan el error estándar.

Tampoco se observan diferencias significativas en función al sitio de muestreo para Talla y Peso además se llevó a cabo un análisis de varianza donde se obtuvieron los siguientes resultados para la talla: $H=0.9119$, $p=0.8225$, $g.l.= 3$; y para el peso: $H=2.6870$, $p=0.4424$, $g.l.=3$, por lo tanto no es significativa la diferencia con respecto al sitio de muestreo.

iii. Análisis de Stocks mezclados

Para los fines del presente estudio, se compiló la información de composición haplotípica de las posibles fuentes de reclutas a los sitios de alimentación en las costas de Campeche. Dicha información se obtuvo de trabajos anteriores de Bass (1999), Díaz-Fernandez *et al.* (1999) y Abreu-Grobois *et al.* (2003) (Tabla 7.8).

Se llevó a cabo el análisis Bayesiano de mezcla de stocks con el programa "Turtle" de Bolker *et al.* (en prep.) para estimar la posible contribución a los sitios de alimentación, se tomó como base los datos de la Tabla 7.8. El resultado indica que un 98% de las tortugas que llegan a las Costas de Campeche son de origen mexicano. Debido a la presencia del haplotipo Cu1= EiA001, el programa arroja un valor de aproximadamente 0.5%, 0.3% y 0.4 y 0.1% de posible contribución de aquellas colonias donde se ha reportado ese haplotipo como el más común. Sin embargo, tomando en cuenta a) los valores de intervalos de confianza y b) que el haplotipo Cu1-EiA001 ha sido reportado en la colonia que anida en Isla Aguada es muy probable que estos individuos también sean de origen mexicano. Teniendo en cuenta los valores y sus intervalos de

confianza, la contribución esperada del resto de las colonias a los sitios estudiados es más bien cero.

Colonia	Contribución %	Intervalos de Confianza	
		Límite Inferior 2.5 %	Límite Superior 97.5%
Antigua	0.31	0.0%	2.6%
Barbados	0.36	0.0%	3.0%
Belice	0.07	0.0%	0.7%
Brasil	0.13	0.0%	1.3%
Cuba-Doce Leguas	0.51	0.0%	3.5%
México-Global	98.19	94.4%	100.0%
USVI	0.08	0.0%	0.8%
Puerto Rico	0.06	0.0%	0.7%
Nicaragua	0.08	0.0%	0.8%
Costa Rica	0.07	0.0%	0.7%

Tabla 8.18. Análisis Bayesiano de mezcla de stocks utilizando el paquete Turtle de Bolker et al (en prep.) Se muestra la contribución estimada de cada colonia de anidación a la población estudiada en Campeche, basado en la MCMC, el cálculo fue a partir de 130 individuos encontrados con haplotipos previamente definidos. Se muestran los límites de confianza en los percentiles 2.5 y 97.5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. DISCUSIÓN

Las tortugas marinas son difíciles de observar dado su complejo ciclo de vida, se sabe que después del nacimiento, crecen en el ambiente pelágico para eventualmente regresar a las costas a alimentarse (Carr, 1987). Estudios previos en sitios de forrajeo revelan que las agregaciones de tortugas en sitios de alimentación están compuestas por mezclas de stocks provenientes de un gran número de colonias reproductoras de la región, algunas distantes en cientos de kilómetros. Las técnicas de genética han revolucionado el esclarecimiento de la composición en estos sitios de mezcla debido a que con marcas moleculares, que caracterizan discretamente poblaciones diferenciadas genéticamente (Bass *et al.*, 1996), no solo se identifican los posibles orígenes sino también se puede calcular la proporción de cada población presente. Esto no es posible con marcas metálicas a menos de que todas las posibles fuentes sean marcadas en la misma intensidad, lo cual no es sencillo ni se ha puesto en práctica. Aplicando los métodos moleculares a la tortuga carey, por ejemplo, Bowen *et al.* en 1996 estudia en las aguas de Mona Island, Puerto Rico y concluye que la mayor contribución a este sitio de alimentación no es de la colonia local sino que proviene de las colonias de toda la región. Broderick *et al.* (1994) en un trabajo realizado en el Norte de Australia también concluye que las tortugas encontradas en esos sitios de alimentación se componen de diversas colonias anidadoras. De igual manera para otras especies como la *Chelonia mydas* (Carr, 1975; Limpus *et al.* 1992) y *Caretta caretta* (Laurent *et al.*, 1993, Sears *et al.*, 1995) indican una composición mezclada de stocks.

Estudios realizados para otras especies en sitios de alimentación como la tortuga verde, *Chelonia mydas* (Lahanas *et al.* 1998) concluyen que en aguas de Bahamas la mayor contribución (79%) es de los haplotipos característicos de Costa Rica, la mayor colonia de la región y por lo tanto concluyen que los tamaños de las poblaciones fuente contribuyen de manera proporcional, independientemente de la distancia de los sitios de alimentación. En el caso de la tortuga verde, la mayoría de las anidaciones en el Atlántico ocurren en Tortuguero, Costa Rica (Lahanas *et al.*, 1998) y en Campeche para la tortuga Carey (Guzmán-Hernández, 2001).

Por otro lado, Bass & Witzell (2000) en un análisis de tortuga verde en un sitio de alimentación en aguas al Este de Florida estimaron que la contribución de Costa Rica es de solamente 48% mientras que la de Florida es de 37%, a pesar de ser una colonia mucho más pequeña pero que está más cercana. Ya que el resultado contrasta con los resultados obtenido por Lahanas *et al.* (1998), los autores sugieren que la diferencia se puede deber a la temporada de muestreo, la densidad de nidadas para ese año, o efectos de las corrientes (Bass & Witzell, 2000).

De manera similar Luke (2003) en un estudio en sitios de alimentación para la tortuga verde en Barbados también observa una contribución similar entre Costa Rica, Florida y Surinam, donde no hay una contribución mayoritaria específica. Concluye que los patrones de corrientes juegan un papel predominante en la definición de cuáles colonias se reclutan, por lo menos al hábitat en Barbados que por su situación a la entrada del Caribe es afectado de manera sobresaliente por corrientes que provienen de otras regiones, esto se relaciona con el presente trabajo dado el impacto que

pueden tener las barreras físicas en la migración de tortugas marinas, se observa que puede ser determinante el flujo de la corrientes para que tortugas juveniles migren a distintos sitios de alimentación.

Se puede observar en los análisis de composición en sitios de alimentación para la tortuga verde que hay diversos patrones: pueden haber contribuciones similares de diversos stocks (Bass & Witzell, 2000; Luke, 2003) o una contribución de un stock dominante (Lahanas *et al.*, 1998). En el caso de la tortuga Carey Bowen *et al.* (1996) presentan contribuciones variadas, pero con predominio de colonias foráneas y Díaz-Fernández (1999) una contribución predominantemente proveniente de las colonias locales.

Debido a la variación en los resultados de distintas investigaciones, es probable que existan factores biológicos u oceanográficos que influyen de manera determinante la composición de stocks en un sitio de alimentación. Bass & Witzell (2000) sugieren que las tortugas más grandes tienden a acercarse a los sitios de alimentación más cercanos a sus sitios de reproducción y por eso la contribución de la colonia "local" fue tan alta. En este caso, se encontraría una correlación entre los tamaños de las tortugas y la identidad genética. Para determinar si existía esta correspondencia, en el presente estudio se analizaron las relaciones entre la identidad haplotípica y dos medidas de tamaño en las tortugas Carey: talla y peso. No hubo diferencias significativas en el peso o talla de los individuos con respecto al haplotipo por lo que se descarta la presencia del efecto como el que sugieren Bass y Witzell (2000).

Witzell *et al.* (2002) demuestran que en un sitio de *Caretta caretta* la composición mayoritaria 79% en sitios de alimentación es de colonias anidadoras cercanas mientras que un 20 % corresponden a haplotipos característicos de la península de Yucatán por lo que sugieren factores ambientales como las corrientes de la región que podrían impactar diferencialmente la deriva de crías de diferentes poblaciones en su fase pelágica (Carr, 1987). De manera más contundente, el trabajo de Luke (2003) con tortuga verde correlaciona las corrientes alrededor de Barbados para explicar la composición de stocks observada.

En un marcado contraste, en este trabajo se comprueba que los sitios de alimentación estudiados en aguas de Campeche se componen prácticamente de un solo stock (por lo menos en un 98%) y que corresponde a las colonias locales. En ningún otro estudio se ha detectado tal grado de predominancia y ausencia de evidencia de inmigración de colonias regionales.

Siguiendo las sugerencias de Witzell *et al.* (2002) y de Luke (2003) cuando se analizan los patrones de corrientes alrededor de la Península de Yucatán y dentro del Golfo de México, queda claro que las dispersiones a las que puedan estar sujetas las tortugas carey en su fase pelágica pueden ser impactadas por barreras físicas y patrones de corrientes de superficie como los que se muestran en la **Figura 9.1**. El flujo más importante, proveniente de la región oriental del Caribe (donde abundan colonias que podrían contribuir con reclutas a los sitios de alimentación en aguas de México) al chocar con la Península de Yucatán es proyectado por un canal muy angosto (Canal de Yucatán) que le da velocidad y fuerza, pero es conducido principalmente hacia la

Florida (Ochoa *et al.*, 2001). Por otro lado, las corrientes superficiales en el Golfo de México tienden a ser ligeras y posiblemente faciliten la permanencia de crías de carey dentro de esta región. De ser correctas estas suposiciones, se esperaría una predominancia de haplotipos de Campeche en los sitios de alimentación estudiados, precisamente lo que se observó.



Figura 9.1. Trayectoria de las boyas tomadas desde 1978 al 2003, datos obtenidos del Laboratorio de Oceanografía y Meteorología del Atlántico.

Si bien sería correcto que como ha sido planteado en estudios anteriores las tortugas carey (al igual que otras especies) cuando son acarreadas durante su fase pelágica son mezcladas con tortugas de diversos orígenes, los grados de mezcla son determinados por la localización geográfica de las colonias origen, los patrones de corrientes y los obstáculos físicos que finalmente definen derroteros y facilidad o dificultad para emigrar. Evidentemente, los tamaños de las poblaciones fuente deberán también afectar la contribución, como lo plantea Lahanas *et al.* (1998).

De ser correcto el planteamiento para el área de Campeche, también se debería encontrar tendencias hacia la homogeneidad genética de las poblaciones locales, como resultado a largo plazo de esos patrones de corrientes que impactarían el proceso

evolutivo. En efecto, estudios previos sobre caracterización genética de la carey en México (Abreu-Grobois *et al.*, 2003) revelan este patrón singular, con valores de diversidad nucleotídica muy por debajo del resto en el Atlántico occidental

Tomando en cuenta la condición de especie en peligro crítico de extinción, la predominancia casi absoluta en los sitios de alimentación de tortugas provenientes de colonias nacionales indicaría que la dinámica de estas poblaciones estará principalmente definida por el manejo que se le den a las colonias reproductoras de la especie en el país (en playas de anidación pero también en los mismos sitios de alimentación). Debido a que existe poca contribución de colonias externas, poco afectarán las variaciones en abundancias de éstas.

Sin embargo, esta conclusión no implica que no existan aportaciones significativas de individuos nacidos en colonias de la Península de Yucatán a sitios de alimentación en la región. La abundancia de las anidaciones y aun, los patrones de corrientes sugieren la posibilidad de que existan flujos importantes hacia otras regiones. Si bien no es el propósito de este trabajo, es conveniente notar que los marcadores moleculares han permitido corroborar la presencia de carey de origen mexicano en sitios de alimentación en diversas áreas desde Cuba hasta Puerto Rico (Díaz-Fernández *et al.*, 1999; Abreu-Grobois *et al.*, 2003). En su conjunto, los resultados continúan reforzando la necesidad de aplicar políticas de manejo para las tortugas marinas de manera conjunta y colaborativa entre los países que las comparten si es que se propone lograr su conservación a largo plazo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. CONCLUSIONES

- Se diseñaron cebadores para la amplificación de esta nueva región de ADN mitocondrial.
- Se aplicaron diversas técnicas moleculares para la amplificación, purificación y secuenciación de este nuevo segmento del ADN.
- Se obtuvo por primera vez la secuencia de 880 nucleótidos de la región control de ADN mitocondrial para la Carey.
- Se estandarizó la metodología para obtener 880 nucleótidos de la región control del ADN mitocondrial.
- Se encontraron 4 sitios polimórficos en la última parte de la secuencia encontrada.
- Aplicando las técnicas moleculares, se conoce la distribución de la variabilidad genética entre las tortugas de carey en sitios de alimentación.
- Se determinó el origen de los individuos a través de los haplotipos ya conocidos en la región del Gran Caribe (Bass, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 1999) y la composición por poblaciones.
- Se encontró que los sitios de alimentación están conformados principalmente por individuos de la región y en menor grado con individuos migrantes de otras regiones.
- En 4 hábitats de alimentación de Campeche la mayoría de los haplotipos encontrados fueron EiA023 (Mx1), y el segundo más abundante el haplotipo EiA039 (q).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Escasa o nula inmigración de fuera del país a estos sitios de alimentación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11. LITERATURA CITADA

- Abreu-Grobois, F.A., Bass, A. L., Briseño-Dueñas, R., Dutton, P.H., Encalada, S.E. and FitzSimmons, N.N. 1996. Mitochondrial DNA D-loop sequences of marine turtles 147-162. Bowen, B.W. and W.N. Witzell (eds.) Proceedings of the International symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC 173 pp.
- Abreu-Grobois, F. A., Briseño-Dueñas, R., Koletzki, D., Garduño- Andrade, M., Guzmán-Hernández, V., Herrera, M. A.. 2003. Filogeografía de las colonias anidadoras de la tortuga Carey, *Eretmochelys imbricata*, en la Península de Yucatán, México. Proyecto UNAM-CONACYT -28087N. Informe Septiembre 2003.
- Allard, M. W., Miyamoto, M. M. , Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. & Bowen, B. W.. 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1994:34-41.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, E. D., Roe, B. A., Sagner, F. , Schreier, P. H. , Smith, A. J. H., Staden, R. & Young, I. G.. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465 (Erratum 291:168).
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, Inc. New York, NY.
- Avise, J. C. 1984. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. Royal Society of London* B312:325-342
- Bass, A. L. 1994. Population genetics of the hawksbill turtle *E. imbricata* in the Caribbean. Trabajo presentado en el 14th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Hilton Head, South Carolina, USA. 1-5 marzo, 1994.
- Bass, A.L.. 1996. Application of isolation by distance models to hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting sites in the Caribbean. In: Bowen, B. W., and Witzell, W.N. (Eds). Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-396. pp. 41-46.
- Bass, A. L. 1999. Genetic analysis to elucidate the natural history and behaviour of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: A review and re-analysis. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 195-199.
- Bass, A. L. & Witzell, W. N. 2000. Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from East Central Florida coasts: Evidence from mtDNA markers. *Herpetologica*, 56(3): 357-367

- Bjorndal, K.A., Carr, A., Meylan, A. B. & Mortimer, J.A.. 1985. Reproductive biology of the hawksbill turtle *E. imbricata* at Tortuguero, Costa Rica, with notes on the ecology of the species of the Caribbean. *Biological Conservation* 34:353-369
- Bjorndal, K. A. 1999. Priorities for research in foraging habitats, p.12-14. In: K. L. Eckert, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds.), *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.
- Bolker, B., Okuyama, T., Bjorndal, K. & Bolten, A. (sometido) Stock estimation for sea turtle populations using genetic markers: accounting for sampling error of rare genotypes. *Ecological Applications*.
- Borst, P. & Grivell, L. A. 1981. Small is beautiful-portrait of a mitochondrial genome. *Nature* 290:443-444
- 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., Nelson, W. S. & Avise, J. C. 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment and conservation relevance. *PNAS USA* 90: 5574-5577
- Bowen, B.W., Kamezaki, N., Limpus, C.J., Hughs, G.H., Meylan, A. B. & Avise, J.C. 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes *Evolution* 48:1820-1828.
- Bowen, B.W., Abreu-Grobois, F.A., Balazs, G.H., Kamezaki, N., Limpus, C.J. & Ferl, R.J. 1995. Trans-pacific migrations of the loggehead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(Feb. 21): 1-4
- Bowen, B. W., Bass. A. L., García-Rodríguez, A., Diez, C. E., Van Dam R., Bolten., A., Bjorndal, K. A., Miyamoto, M. M. & Ferl, R. J. 1996. Origin of Hawksbill turtles in a Caribbean Feeding area as indicated by genetic markers. *Ecological Applications* 6:566-572.
- Briseño-Dueñas, Raquel. 1998. Variación Genética en la Región Control del DNA Mitochondrial de Poblaciones de la Tortuga Golfina, *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico Oriental y las implicaciones para su conservación. *Universidad Autónoma de Sinaloa*.
- Broderick, D., Moritz, C., Miller, J.D., Guinea, M., Prince, R.I.T. & Limpus, C.J. 1994. Genetic studies of the hawksbill turtle *E. imbricata* : evidence for multiple stocks in Australian waters. *Pacific Conservation Biology* 1:123-131.

- Brown, G. G. & Simpson, M. V. 1981. Intra- and interspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: Restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetics* **97**:125-143
- Brown, G. G. & Simpson, M. V. 1982. Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **79**:3246-3250.
- Brown, W. M. & Wright, J. W. 1979. Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science* **203**:1247-1249.
- Brown, A. H. D., Feldman, M. W. & Nevo, E. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**:523-536.
- Carr, A. F. 1975. The Ascension Island green turtle colony. *Copeia* **1975**:547-555
- Carr, A. F. & Meylan, A. B. 1980. Extinction or rescue for the hawksbill? *Oryx* **15**(5):449-450.
- Carr, A. F. 1987. New perspective on the pelagic stage of sea turtle development. *Conservation Biology* **1**:103-121
- Dalrymple, G. H., Hampp, J. C. & Wellins, D. J. 1985. Male-biased sex ratio in cold nest of a hawksbill sea turtle *E. imbricata*. *Journal of Herpetology* **19**:158-420.
- Díaz-Fernández, R., Okayama, R., Uchiyama, T., Carrillo, E., Espinosa, G., Márquez, R., Díez, C. & Koiki, H. 1999. Genetic sourcing for the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the northern Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology*. **3** (2): 296-300.
- Eckert, K. A. 1992. Five year status reviews of sea turtles listed under the Endangered Species Act of 1973: Hawksbill Sea Turtle *E. imbricata*. U.S. Fish and Wildlife Service P.O. No. 20181-1-0060. 20p.
- Eckert, K. A. 1995. Hawksbill sea turtle (*E. imbricata*). Pp. 76-108. In: Status Reviews for Sea Turtles Listed under the Endangered Species Act of 1973. National Marine Fisheries Service, Silver Spring, Maryland.
- Eckert, K. L., Bjørndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A. & Donnelly, M. (eds.). 1999. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. 235 pp
- Ehrhart, L. M. & Ogren, L. H. 1999. Studies in Foraging Habitats: Capturing and Handling Turtles. 1999. Eckert, K. L. & Abreu-Grobois, F. A. (eds.) Marine Turtle Conservation in the Wider Caribbean Region : A Dialogue for Effective Regional Management, March 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ferris, S.D., Sage, R. D., Prager, E. M., Ritte, U. & Wilson, A. C. 1983c. Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics* **105**: 681-721
- Engstrom, T. N., Meylan, P. A. & Meylan, A. B. 2002. Origin of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in a tropical developmental habitat in Caribbean Panamá. *Animal Conservation* (2002) The Zoological Society of London **5**:125-133.
- Frazier, J. G. 1991. Una evaluación del manejo de nido de tortugas marinas en la Península de Yucatán, p.37-76. In: J. Frazier, R. Vazquez, E. Galicia, R. Durán y L. Capurro. *Memorias del IV Taller Regional sobre Programas de Conservación de Tortugas Marinas en la Península de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Frazier, J. G. 1999. Community-based conservation, p.15-18. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication NO. 4., Washington D.C. 235 pp.
- Frazier, J. G., 2001. Generalidades de la Historia de Vida de las Tortugas Marinas. *Memorias. Conservación en la Región del Gran Caribe: Un Diálogo para el Manejo Efectivo*. Santo Domingo, República Dominicana. Noviembre de 1999.
- Garduño-Andrade, M., Guzmán-Hernández, V., Miranda, E., Briseño, R., and F.A. Abreu-Grobois, A. (to be submitted to *Chelonian Conservation and Biology*). Increases in the records of nesting and nest density of the hawksbill turtle, *E. imbricata*, in the Yucatan Peninsula, Mexico (1997-1996).
- Garduño-Andrade, M. 1998. *Ecología de la tortuga de carey (E. imbricata) en la zona de Las Coloradas, Yucatán, México*. Tesis doctoral Posgrado Interinstitucional de Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima.
- Garduño-Andrade, M., Guzmán-Hernández V., Miranda, E., Briseño-Dueñas, R. y Abreu-Grobois, F.A., 1999. Increases in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nestings in Yucatán Peninsula, México, 1997-1996: data in support of successful conservation. *Chelonian Conservation and Biology*.
- Gutiérrez-Rivera, J. N. 2002. *Clonación y Expresión de un Receptor de Hormona Glicoproteico en Ovario de Botete (Sphoeroides annulatus)*. Tesis de Maestría, CIAD Mazatlán. 127 p.
- Guzmán-Hernández, V., 1995. *Evaluación de las poblaciones desovantes de tortugas marinas de Campeche, México en el periodo de 1992 a 1994*. Informe de Investigación de Tortugas Marinas, INP-CRIP Carmen. 8 pp. Inédito.
- Guzmán-Hernández, V. & Garduño Andrade, M. 1998. Changes in nesting frequency or *Eretmochelys imbricata* in Campeche, México, over two decades. Paper presented at the

- 18th International Symposium on the Sea Turtle Biology and Conservation. Mazatlán, Sinaloa, México 3-7 March, 1998.
- Guzmán-Hernández, V. 2001. Evaluación de las poblaciones de tortugas marinas de Campeche. Reporte de Investigación 2001//INE/DGVS/TM-007-CAMP. Centro Regional de Investigación Pesquera de Ciudad del Carmen Campeche.
- Gyllensten, U.B. 1985. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species. *J. Fish Biol.* 26:691-699
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997. Principles of Population Genetics. Third Edition. Sunderland Massachusetts.
- Hillis, Z. & Mackay, A. L. 1989. Research report on nesting and tagging of hawksbill sea turtles *E. imbricata* at Buck Island Reef National Monument, U.S. Virgin Islands, 1987-88. National Park Service, purchase order PX 5380-8-0090. 25p.
- Hillis, D., & Moritz, C. 1990. Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA.
- Hintz, J. 1996. Program NCSS 6.021 Jr_ Demo Released: March 11, 1996. NCSS, 329 North 1000. East Kaysville, UT 84037. <http://www.ncss.com>
- Lahanas, P. N., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Encalada, S. E., Miyamoto, M. M., Valverde, R. A., B. W. Bowen. 1998. Genetic composition of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology* 130:345-352
- Laurent, L., Lescure, J., Excoffier, L., Bowen, B. W., Domingo, M., Hadjichristophorou, M., Kornaraki, L. & Trabuchet, G. 1993. Genetic relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with mitochondrial marker. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris, Sciences de la vie* 316 :1233-1239.
- Limpus, C. J., Miller, J.D., Baker, V. & McLachland, E. 1983. The hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in north-eastern Australia: the Campbell Island rookery. *Australian wild life research* 19: 489-506.
- Limpus, C.J. 1992. The hawksbill turtle, *E. imbricata*, in Queensland: population structure within a southern Great Barrier Reef feeding ground. *Wildlife Research* 19:489-506
- Linnaeus, 1766. *C. Systemae naturae per regna tria. Editio duodecima, reformata*. Vol. 1. 350 p.
- Mack, D., Duplaix, N. & Wells, S. 1979. *The sea turtle: an animal of divisible parts. International trade in sea turtle products*. TRAFFIC (USA). Washington, D.C..

- Marquez, R., 1970, Las tortugas marinas de México. México, Instituto Nacional de Investigaciones Biológico-pesqueras, Industrias Canexas, Publicaciones, 206 p.
- Márquez, R., Villanueva, A. & Peñaflores, C. 1976. Sinopsis de datos biológicos sobre la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* en México. INP Sinopsis sobre la pesca (2): 61 p.
- Meylan, A. 1982. Sea turtle migration—evidence from tag returns. Pages 91-100. In K.A. Bjorndal (ed.), *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Meylan, A. 1984a. Biological synopsis of the hawksbill turtle *E. imbricata*. In P. Bacon, F. Berry, Bjorndal, K., Hirth, H., Ogren, L. & Weber, M. (eds.), *Proceedings of the Western Atlantic Turtle Symposium*. Volume 1. RSMAS Printing, Miami, Florida.
- Meylan, A. 1984b. Feeding ecology of the hawksbill turtle *E. imbricata*: Spongivory as a feeding niche in the coral reef community. Unpublished Ph. D. Dissertation. University of Florida, Gainesville, Florida. 117p.
- Meylan, A. B. 1989. Status Report of the hawksbill turtle. Pages 101-115 in L. Ogren, F. Berry, K. A. Bjorndal, H. Kumpf, R. Mast, G. Medina, H. Reichart, and R. Whitman, editors. *Proceedings of the Second Western Atlantic Turtle Symposium*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-226. National Technical Information Service, Springfield, Virginia, USA.
- Meylan, A. B., Bowen, B. W. & Avise, J. C. 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* **248**: 724-727
- Meylan, A. B., Schroeder, B. & Mosier, A. 1997. *Biology and Status of the Hawksbill in the Caribbean*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group. Washington, DC USA
- Meylan, A. B. 1999a. International Movements of immature and adult hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology* **3(2)**:189-194.
- Meylan, A. B. & Donnelly, M. 1999. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as Critically Endangered on the 1996 IUCN Red List of the Threatened Animals. *Chelonian Conservation and Biology* **3(2)**: 200-224.
- Milliken, T., & Tokunaga, H. 1987. The Japanese sea turtle trade 1970-1986. A special report prepared by TRAFFIC (JAPAN). Washington D.C.: Center for Environmental Education, 171 pp.
- Mortimer, J.A. & Bresson, R. 1999. Temporal Distribution and Periodicity in hawksbill turtles (*E. imbricata*) nesting at Cousin Island, Republic of Seychelles, 1971-1997. *Chelonian Conservation and Biology*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Mullis, K. & F. Faloona. 1987. Specific síntesis of DNA in vitro via a polymerasa catalyzed Chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
- Nicholas, K. B., & Nicholas, H. B. Jr. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. www.psc.edu/biom11ed/genedoc.
- Ochoa, J., Sheinbaum, H., Badan, A., Candela, J. & Wilson, D. 2001: Geostrophy via potential vorticity inversion in the Yucatan Channel. *Journal of Marine Research*, **59**: 725-747.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In *Molecular systematics*, second edition: 205-247. Hillis, D. M., Maritz, C. & Mable, B.K. (Eds). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Parsons, J.J. 1972. The hawksbill turtle and the tortoise shell trade. Pp. 45-60. In: *Etudes de géographie tropicale offertes a Pierre Gourou*. Paris, Mouton.
- Pritchard, P. C. H., & Trebbau, P. 1984. The turtles of Venezuela. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, *Contrib. Herpetologica* No.2 307pp
- Siegel, S. 1978. Estadística no paramétrica. Capítulo 7, La prueba de χ^2 para k muestras independientes. Editorial Trillas, México. Pp 204-224
- Sears, C. J., Bowen, B. W., Chapman, R.W., Galloway, S. B., Hopkins-Murphy, S. R., & Woodley, C. M. 1995. Demographic composition of the feeding population of juvenile loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) off Charleston, South Carolina: evidence from mitochondrial DNA markers. *Marine Biology*.
- Smith, H.M., & Smith, R. B. 1979. Synopsis of the herpetology of Mexico. Vol. VI. Guide to Mexican Turtles. John Johnson, North Bennington, VT. 1044 p.
- Van Dam, R. & Sarti, L. 1989. Sea turtle biology and conservation on Mona Island, Puerto Rico. Report for 1989. Chelonia, Sociedad Herpetológica de Puerto Rico.
- White, P.C. & Densmore, L.D. 1992. Mitochondrial DNA Isolation. pp. 29-58 En: A.R. Hoezel (ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Pres, N.Y.
- Witzell, W. N. 1983. Synopsis of biological data on the Hawksbill Turtle, *E. imbricata*. FAO Fisheries Synopsis No. 137. 78 p.
- Witzell, W. N., Bass, A. L., Bresette, M. J., Singewald, D. A., Gorham, J. C. 2002. Origin of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) at Hutchinson Island, Florida: evidence from mtDNA markers.

- Wood, C.C., McKinnell, S., Mulligan, T. J. & Fournier, D. A. 1987. Stock identification with the maximum-likelihood mixture model: sensitivity analysis and application to complex problems. *Can. Journal Fish Aquatic Science* **44**: 866-881
- Xu, S., Kobak, C. J. & Smouse, P.E. 1994. Constrained least square estimation of mixed population stock composition from mtDNA haplotype frequency data. *Can. Journal Fish Aquat Science* **51**: 417-425
- Zaykin, D.V. & Pudovkin, A. I. 1993. Two programs to estimate significance of Chi-square values using pseudo-probability test. *Journal Heredity* **84**:152

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE A

COLECCION Y PRESERVACION SIN REFRIGERACION DE SANGRE PARA ANALISIS GENETICO DEL ADN

(modificado del protocolo de Brian Bowen y de White & Densmore, 1992)

MATERIALES PARA LA COLECTA DE SANGRE:

- Tubos de plástico con tapa de rosca hermética sin anticoagulante
- Para crías- de 2 ml capacidad con 0.9 ml de buffer
- Para adultos- de 10 ml capacidad con 8.5 ml del buffer
- Buffer lítico SDS (ver receta más adelante)
- Jeringas:
 - o para adultos- de 3 ml con agujas 20 x 38 mm (ej. B-D Plastipak)
 - o para crías- de insulina
- Guantes de hule desechables
- Hojas de datos
- Marcador indeleble
- Bolsa de plástico

MÉTODOS PARA LA COLECTA DE SANGRE:

1. Colectar 1-2 ml de sangre del adulto ó 0.2 ml de una cría, extrayendo la misma del seno dorsal cervical
2. Mezclar la sangre inmediatamente con el buffer lítico en el tubo de plástico en una proporción 1:10
sangre:buffer

3. Invertir cuidadosamente el tubo varias veces para mezclar. Algunas veces se obtendrá una solución parcial de la sangre.
4. Almacenar las muestras a temperatura ambiental durante varios meses, o en refrigerador hasta un año. Evite exposición al calor o luz solar.
5. Revisar que quedaron bien sellados los tubos guardar en doble bolsa de plástico cerrada herméticamente para evitar fugas.

1. 76.04 g de EDTA-Na ₄ (conc. final 100mM)
2. 24.22 g de Tris (conc. final 100mM)
3. 1.17 g de NaCl (conc. final 10mM)
4. 20 g SDS (conc. final 1% pes/vol)
5. aforar a 2 litros con agua destilada y ajustar el pH a 8.0 con HCl

Nota 1: SDS es sodium dodecyl sulfate (= sodium lauryl sulfate)

Nota 2: El buffer lítico SDS no es tóxico y puede ser almacenado por periodos extensos a temperatura ambiental

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE C

Electroforesis

Los productos de PCR se reconocen corriendo un gel de agarosa al 2% en una cámara de electroforesis (E-C minicell, USA) con una voltaje constante de 70V entre 30 y 45 min. La electroforesis se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Se prepara un gel de agarosa al 2%.
2. Se mezcla el producto de PCR con 2 ul de buffer de carga (6X sucrosa).
3. El ADN se coloca en las pozas del gel.
4. Se aplica carga de 80 volts por aprox. 30 min.
5. El gel se observa en un transiluminador de UV de onda corta.
6. Se documenta el resultado usando una cámara de fotografías instantáneas (Polaroid, USA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE D

Purificación

a) Purificación de productos PCR (QIAquick Spin Columns kit, Qiagen Inc, USA):

1. Añadir al tubo de PCR 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen del producto PCR y agitar.
2. Preparar las columnas Qiagen.
 - a) Agregar las muestras a las columnas y centrifugar (se utilizó una centrifuga Heraeus Biofuge Primo R, Germany) un minuto.
 - b) Eliminar los lavados.
 - c) Agregar a cada tubo 750 µl de buffer PE.
 - d) Incubar los tubos por cinco minutos a temperatura ambiente.
 - e) Centrifugar por un minuto.
 - f) Eliminar los lavados.
 - g) Centrifugar los tubos por un minuto para eliminar todo el etanol.
 - h) Colocar las columnas en microtubos limpios de 1.5 ml.
 - i) Para eluir el ADN agregar directamente a la membrana 25 µl de buffer EB a cada tubo.
 - j) Incubar los tubos un minuto a temperatura ambiente y centrifugar un minuto.
 - k) Correr gel de agarosa 2% por electroforesis (88 volts, 35 minutos), para verificar la presencia de la banda purificada

b) Purificación de productos PCR con Kit de Promega:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Añadir a un tubo con producto de PCR 100 ul de buffer para purificación directa más de 1 ml de resina y mezclar con pipeta.
2. Colocar mezcla en la jeringa con columna filtradora.
3. Ejercer presión sobre el émbolo lentamente.
4. Colocar en jeringa de 2 ml de isopropanol al 80% y lavar la columna.
5. Adaptar la columna a tubo inicial y centrifugar por 2 min a 10,000 rpm.
6. Colocar la columna en un tubo limpio.
7. Añadir 50 ul de agua sin nucleasas.
8. Centrifugar 20 seg a 12,000 rpm.
9. Correr alícuota de ADN purificado en gel de agarosa 2% para verificar.
10. Se almacena el producto a -20°C .

c) Purificación con fragmentos extraídos del gel de agarosa se utilizó el sistema Qiagen.

La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el kit de Qiagen (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen Inc, USA).

1. Pesar tubos de 1.5 ml (uno por muestra).
2. Cortar las bandas deseadas con navaja esteril y colocar en microtubos (uno por muestra). Los cortes se realizan dentro de un transiluminador (ULTRA LUM, EA-40 USA) de UV de onda larga (para no dañar el ADN).
3. Pesar los tubos mas el gel y calcular el volumen del gel.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Agregar seis volúmenes del buffer QG por cada volumen de gel.
5. Incubar a 50°C en termoblock (VWR Scientific industries Inc. USA) durante 10 minutos haciendo vortex cada 2 o 3 minutos (VWR Vortex mixer, Scientific industries Inc. USA).
6. Agregar un volumen de isopropanol a cada tubo y mezclar.
7. Preparar columnas.
8. Agregar las muestras a las columnas y se centrifugar (Heraeus Biofuge Primo R, Germany) un minuto.
9. Eliminar lavados
10. Agregar 500 µl de buffer QG a cada tubo y centrifugar un minuto.
11. Eliminar lavados
12. Añadir 750 µl de buffer PE.
13. Incubar los tubos por cinco minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar por 1 minuto.
15. Eliminar lavados.
16. Centrifugar por un minuto para eliminar el etanol.
17. Colocar las columnas en microtubos limpios de 1.5 ml.
18. Eluir con 25 µl de buffer EB directo a la membrana de la columna.
19. Incubar los tubos un minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 12,000 rpm.
20. Correr gel de agarosa 2% por electroforesis (88 volts, 35 minutos), para verificar la presencia de la banda purificada

d) Purificación directa con el sistema de la Exonucleasa y Fosfatasa alcalina.

1. En un tubo esteril y limpio agregar 5 μ l del producto PCR
2. Añadir 1 μ l de Exonucleasa y 1 μ l de Fosfatasa Alcalina.
3. Calentar 15 min a 37°C
4. Calentar 15 min a 80°C

e) Purificación directa con Sistema Minelute Qiagen.

1. Añadir al tubo de PCR 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen del producto PCR y agitar.
2. Preparar las columnas Minelute Qiagen.
3. Agregar las muestras a las columnas y centrifugar (centrífuga Heraeus Biofuge Primo R, Germany) un minuto.
4. Eliminar los lavados.
5. Agregar a cada tubo 750 μ l de buffer PE.
6. Incubar los tubos por cinco minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar por un minuto.
8. Eliminar los lavados.
9. Centrifugar los tubos por un minuto para eliminar todo el etanol.
10. Colocar las columnas Minelute en microtubos limpios de 1.5 ml.
11. Para eluir el ADN agregar directamente a la membrana 10 μ l de Agua Ultrapura 18 O a cada tubo.
12. Incubar los tubos un minuto a temperatura ambiente y centrifugar un minuto.

13. Correr gel de agarosa 2% por electroforesis (88 volts, 35 minutos), para verificar la presencia de la banda purificada

f) Purificación con fragmentos extraídos del gel de agarosa se utilizó el sistema Minelute Qiagen.

1. Pesar tubos de 1.5 ml (uno por muestra).
2. Cortar las bandas deseadas con navaja esteril y colocar en microtubos (uno por muestra). Los cortes se realizan dentro de un transiluminador (ULTRA LUM, EA-40 USA) de UV de onda larga (para no dañar el ADN).
3. Pesar los tubos mas el gel y calcular el volumen del gel.
4. Agregar seis volúmenes del buffer QG por cada volumen de gel.
5. Incubar a 50°C en termoblock (VWR Scientific industries Inc. USA) durante 10 minutos haciendo vortex cada 2 o 3 minutos (VWR Vortex mixer, Scientific industries Inc. USA).
6. Agregar un volumen de isopropanol a cada tubo y mezclar.
7. Preparar columnas.
8. Agregar las muestras a las columnas y se centrifugar (Heraeus Biofuge Primo R, Germany) un minuto.
9. Eliminar lavados
10. Agregar 500 µl de buffer QG a cada tubo y centrifugar un minuto.
11. Eliminar lavados
12. Añadir 750 µl de buffer PE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13. Incubar los tubos por cinco minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar por 1 minuto.
15. Eliminar lavados.
16. Centrifugar por un minuto para eliminar el etanol.
17. Colocar las columna en microtubos limpios de 1.5 ml.
18. Eluir con 10 μ l de agua ultra pura 18 O directo a la membrana de la columna.
19. Incubar los tubos un minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 12,000 rpm.
20. Correr gel de agarosa 2% por electroforesis (88 volts, 35 minutos), para verificar la presencia de la banda purificada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE E

CLONACIÓN

El proceso de clonación de ADN requiere de aislar un fragmento de ADN, ligarlo a un vector, introducirlo a un microorganismo (generalmente bacterias) para que al crecer produzca grandes copias puras de esa secuencia de ADN. Por último el ADN puro (el de interés) se extrae de las bacterias para su secuenciación.

1. LIGACIÓN

Se realiza con el fin de insertar los fragmentos de ADN en un vector (en este caso es un plásmido que confiere resistencia a ampicilina).

A partir del ADN purificado se realiza la ligación utilizando el vector pGEM-T (Easy Vector System I, Promega USA), el buffer para la ligasa y T4 ADN ligasa, los que son de la misma casa comercial (Promega). Las proporciones de la mezcla de ligación se especifican a continuación:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REACTIVO	V + I (μl)	V (μl)
Agua	-	8
Buffer 2X	10	10
PGEM-T (vector)	1	1
ADN	8	-
T4 ADN ligasa	1	1
Total	20	20

V = vector, I = inserto.

La ligación con el vector solo se hace como control.

1. Incubar toda la noche a 4°C ó 2 h a temperatura ambiente.
2. Congelar a -20°C.

2. TRANSFORMACIÓN

La transformación es una alteración genética de una célula causada por tomar y replicar ADN exógeno. Los vectores (con el inserto) pueden ser introducidos y replicados por células competentes de *E.coli*. La transformación se realiza por un choque térmico.

1. Se colocan las cajas de petri con LB-AMP (AMP = ampicilina a una concentración final de 60 μg/ml, LB = Luria Broth Base) en la incubadora a 37°C (VWR Scientific mod. 1565 USA) para eliminar el exceso de humedad.

2. Se toman los viales (uno para el vector + inserto y el otro para el vector solo como control) de células competentes *E.coli* (DH5a, GIBCO-INVITROGEN, CALIFORNIA E.U.A.) del ultracongelador poniéndolos inmediatamente en hielo y dejar descongelar (en hielo) .
3. Se hace la mezcla de ligación:

MEZCLA	V + I (μl)	V (μl)
Bacterias <i>E. coli</i>	50	50
Mezcla de ligación	5	5

4. Se incuba en hielo por 30 minutos.
5. Se hace choque térmico a 37°C en termoblock por 20 segundos, se colocan inmediatamente en hielo.
6. Se dejan en hielo dos minutos.
7. Se agrega 1.5 ml de SOC (2% de bacto peptona, 0.5% de cloruro de sodio, 1% de cloruro de potasio 250mM y 2% de glucosa 1M) y se transfiere a tubo de centrifuga de 10 ml (estéril).
8. Se incuban una hora a 37°C con agitación a 240 rpm (LAB-LINE, USA).
9. Se centrifugan cinco minutos a 8000 rpm.
10. Se descartan los sobrenadantes y se resuspenden los pellets con el sobrenadante residual.

11. Se siembran 10 μ l en una caja de LB-AMP y el resto en otra caja.
12. Se incuban a 37°C toda la noche .

3. INOCULACIÓN DE COLONIAS

El levantamiento de colonias consiste en inocular tubos con caldo LB- AMP con las colonias que crecen, utilizando palillos de madera estériles, se toma una colonia por tubo, el número de colonias levantadas depende de la recombinación, aparte se adiciona un tubo más con medio sin inocular como control negativo.

1. Se prepara caldo LB-AMP al momento de usar (120 μ l de ampicilina a una concentración de 25 mg ml⁻¹ por cada 50 ml de LB)
2. Se distribuyen dos mililitros en tubos de fondo redondo (falcon #2059).
3. Se toman colonias aisladas con palillos de madera estériles y se colocan en los tubos falcon (de 6 a 10 colonias por caja, una colonia por tubo).
4. Se incuban toda la noche a 37°C con agitación (240 rpm).

4. MINIPREPS

La técnica de minipreps se realiza para hacer la extracción del plásmido contenido en la bacteria (*E. coli*), para este fin se utiliza el kit de Promega (Wizard Plus SV Minipreps Promega, USA).

1. Se transfieren 1.5 ml del cultivo a un microtubo estéril de 1.5 ml.
2. Se centrifugan un minuto a máxima velocidad y se descartan los sobrenadantes.
3. Se agregan a los tubos 250 µl de "resuspension solution" y se mezclan con vortex.
4. Se agregan 250 µl de "lysis solución" (a cada tubo), invirtiendo el tubo 4 veces.
5. Se incuban los tubos cinco minutos a temperatura ambiente.
6. Se agregan 10 µl de proteasa alcalina a cada tubo.
7. Se incuban cinco minutos a temperatura ambiente.
8. Se agregan a cada tubo 350 µl de "Wizard plus SV neutralización solution", invirtiendo el tubo para mezclar.
9. Se centrifugan los tubos a máxima velocidad (aproximadamente 14000 x g) por 10 minutos.
10. Se preparan las columnas y se transfieren los sobrenadantes sin tocar el pellet.
11. Se centrifugan los tubos a máxima velocidad por un minuto a temperatura ambiente.
12. Se agregan a cada tubo 750 µl de "column wash solution" previamente diluido con etanol al 95%.
13. Se centrifugan de nuevo los tubos a máxima velocidad por un minuto a temperatura ambiente y se descartan los sobrenadantes.
14. Se repete el lavado con 250 µl de "column wash solution"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

15. Se centrifugan los tubos a máxima velocidad por dos minutos a temperatura ambiente.
16. Se transfieren las columnas a microtubos nuevos (estériles) de 1.5 ml
17. Se eluye el ADN plasmídico agregando 30 μ l de agua libre de nucleasas, a la columna.
18. Se centrifugan los tubos (a máxima velocidad) por un minuto a temperatura ambiente, para obtener el ADN.

5. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON ECO RI.

La digestión con enzimas de restricción son útiles en la clonación para identificar los clones que portan la secuencia de ADN deseada y así seleccionar el clon de la muestra que se va a secuenciar. La enzima utilizada fue Eco RI (Promega, USA).

REACTIVO	1 X (μ l)
Agua (estéril)	6.9
10 X Buffer ECO RI	1.0
BSA 10 X	0.1
ECO RI (enzima)	1.0
Total	9.0

1. Se colocan nueve μ l por muestra en microtubo (1.5 ml) y se agregó 1 μ l de ADN.

2. Se incuban a 37°C por dos horas (incubadora VWR scientific mod 1565, USA).
3. Se agregan dos μl de colorante (6X Dye) por cada tubo.
4. Se corre un gel de agarosa al 1 % por electroforesis, 88 volts por 35 minutos (fuente de poder E-C minicell, USA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 1

**Datos de colecta en sitios de alimentación de tortuga carey en la Península
de Yucatán, México**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Especie	Ident. catálago	Ident. sistema	Tamaño	Fech. Inj.	Marca	LCC	Pres. (kg)	Lat.	Long.	Colectores	Fecha observ.	día	mes	Año colecta	Temporada	Estado	sexo	Fecha extracción	Resolución regional control de ADE del	Observaciones	
E1	558	3	semgr	24-Ene-02	FS001	27.5.26.5	2		V. Gumbán	AGI	22	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	EA23	Tronco de caudero	
E2	560	3	semgr	24-Ene-02	FS002	25.5.29.5	3(2)	186638	9131026	V. Gumbán	19	7	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	04/02/2002 19/02/02	NA	NO como talón de muestra a los que se dan para PCR	
E3	561	4	semgr	24-Ene-02	FS003	42.2.45.5	7(9)	186638	9131071	V. Gumbán	31	7	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	04/02/2002	NA		
E4	562	4	semgr	24-Ene-02	FS004	42.2.45.5	8(1)	186638	9131071	V. Gumbán	2	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	NA		
E5	563	8	semgr	24-Ene-02	FS006-027	47.46.10.3	10(3)	186638	9131064	V. Gumbán	3	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	NA		
E6	564	7	semgr	24-Ene-02	FS008	38.5.37.5	5(8)	186638	9132015	V. Gumbán	3	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	NA	Dato para	
E7	565	8	semgr	24-Ene-02	FS009	40.6.38.3	6(26)	186638	9132011	V. Gumbán	3	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	EA23		
E8	566	9	semgr	24-Ene-02	FS010	41.4.35.3	8(8)	186638	9131138	V. Gumbán	3	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	EA23		
E9	567	10	semgr	24-Ene-02	FS011	41.4.35.3	8(1)	186638	9131131	V. Gumbán	35	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/02/2002	EA23		
E10	568	11	semgr	24-Ene-02	FS012	35.29.3	2(3)														
E11	569	12	semgr	24-Ene-02	FS013	41.40.3	7(3)			Chela Fuentes	7	8	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/02/2002	EA23		
E12	570	13	semgr	24-Ene-02	FS014	56.36.3	21(9)			Alexander Montoya	21	11	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	04/02/2002	NA	Tronco de caudero	
E13	571	14	semgr	24-Ene-02	FS017	40.37.3	2(8)			José Luis Velasco	26	11	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	04/02/2002	NA	Los especímenes (incl. Corvo de Corvo)	
E14	572	15	semgr	24-Ene-02	FS018	35.57.3	27			José Luis Velasco	13	12	2001	2001	juvent	AD1	Sexo Aguardado	18/02/2002 04/03/02	EA23		
E15	573	16	semgr	24-Ene-02	FS019	25.5.24.5	1(8)			Guadalupe Sánchez	8	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	16/02/2002	NA			
E16	574	17	semgr	24-Ene-02	FS020	24.23	1(2)			Andrés Cameros	10	2	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	18/02/2002	NA		
E17	575	18	semgr	24-Ene-02	FS021	25.5.15.5	4(2)			Estelita Fuentes	4	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	510 mg residuos más otros especímenes solo la segunda B	
E18	576	18	semgr	24-Ene-02	FS021	25.5.15.5	4(1)	187938	9130881	José Luis Velasco	11	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Residuos de la segunda B	
E19	577	20	semgr	24-Ene-02	FS024	17.46.3	3(2)														
E20	578	21	semgr	24-Ene-02	FS027	16.79.4	4(3)	186627	9130863	José Luis Velasco	21	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Contaminado por residuos plásticos. Se guardó especímenes por separado	
E21	579	22	semgr	24-Ene-02	FS028	18.64.4	3(2)	186628	9132294	Alfonso Velasco	6	4	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	12/09/2002	NA	Contaminado por residuos plásticos	
E22	580	23	semgr	24-Ene-02	FS029	7.44.6	4(2)			Ramón Puch Acosta	26	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Barrido a 1 metro. Contaminado, guarda especímenes solo	
E23	581	24	semgr	24-Ene-02	FS030	18.5.8.4	1(1)			Ramón Puch Acosta	1	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Barrido a 1 metro. Parte Contaminado	
E24	582	25	semgr	24-Ene-02	FS031	11.72.5	4(3)			Ramón Puch Acosta	1	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	EA23	Barrido a 1 metro. Parte Contaminado	
E25	583	26	semgr	24-Ene-02	FS032	48.43	11(5)			Félix Velasco	11	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	EA23	Barrido, no permitidos 2002	
E26	584	27	semgr	24-Ene-02	FS033	38.5.18	8(26)			Guadalupe Sánchez	11	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	12/09/2002	NA	Prof. Arroyo pasó con nos 2	
E27	585	28	semgr	24-Ene-02	FS034	25.5.14	17	186615	9131198	V. Gumbán	3	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Carro del resaca 4 jug	
E28	586	29	semgr	24-Ene-02	FS035	48.43	7(3)			Camero Fuentes	7	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Carro del resaca 4 jug	
E29	587	30	semgr	24-Ene-02	FS038	25.5.13	1(4)			Guadalupe Sánchez	25	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Colección por del espécimen	
E30	588	31	semgr	24-Ene-02	FS039	18.62.47	6(7)			Ramón Puch Acosta	26	3	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	12/09/2002	NA	huevo	
E31	589	32	semgr	24-Ene-02	FS039	25.5.24	1(5)			Luís Gómez	1	5	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Colección a 1 metro. guarda especímenes solo	
E32	590	33	semgr	24-Ene-02	FS040	29.21.5	1(5)	186609	9131151	V. Gumbán	1	5	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Residuos de la jug	
E33	591	34	semgr	24-Ene-02	FS041	31.13	3(8)	186602	9131215	V. Gumbán	1	4	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Residuos de la jug	
E34	592	35	semgr	24-Ene-02	FS043	28.5.27	2(5)	186611	9131215	V. Gumbán	1	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	NA	Residuos de la jug	
E35	593	36	semgr	24-Ene-02	FS044	34.31	14(26)			Reynold García	1	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	12/09/2002	NA	En el barro con planta	
E36	594	37	semgr	24-Ene-02	FS046	29.21.5	2(5)	186607	9132000	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	NA	Carro Resaca	
E37	595	38	semgr	24-Ene-02	FS047	50.48	13(8)	186609	9131198	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	13/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E38	596	39	semgr	24-Ene-02	FS048	28.5.27.5	2(1)	186604	9131198	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E39	597	40	semgr	24-Ene-02	FS050	50.48	11(25)	186611	9132000	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E40	598	41	semgr	24-Ene-02	FS051	51.8.50	14(35)	186609	9131198	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E41	599	42	semgr	24-Ene-02	FS052	29.21.5	2(5)	186605	9131217	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E42	600	43	semgr	24-Ene-02	FS054	50.48	13(8)	186609	9131198	V. Gumbán	8	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E43	601	44	semgr	24-Ene-02	FS058	29.21.5	2(8)	186598	9131198	V. Gumbán	13	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro del resaca 4 jug	
E44	602	45	semgr	24-Ene-02	FS061	38.5.15	8(8)	186594	9131198	V. Gumbán	10	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro del resaca 4 jug	
E45	603	46	semgr	24-Ene-02	FS066	40.38	6(1)	186603	9131221	V. Gumbán	15	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro del resaca 4 jug	
E46	604	47	semgr	24-Ene-02	FS069	45.43	8(8)			José Luis Velasco	16	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro del resaca 4 jug	
E47	605	48	semgr	24-Ene-02	FS070	17.3.19	3(5)			José Luis Velasco	19	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro del resaca 4 jug	
E48	606	49	semgr	24-Ene-02	FS080	18.5.18	17(8)			Alfonso Velasco	22	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E49	607	50	semgr	24-Ene-02	FS083	38.58	11(8)			José Luis Velasco	25	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E50	608	51	semgr	24-Ene-02	FS085	42.38.5	6(8)			José Luis Velasco	26	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E51	609	52	semgr	24-Ene-02	FS086	28.5.27.5	2(1)	186605	9131198	V. Gumbán	28	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Carro Resaca	
E52	610	53	semgr	24-Ene-02	FS087	38.5.14	7(1)	186611	913214	V. Gumbán	28	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Residuos de la jug	
E53	611	54	semgr	24-Ene-02	FS088	38.5.14	7(1)	186611	913214	V. Gumbán	28	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Residuos de la jug	
E54	612	56	semgr	24-Ene-02	FS089	38.5.17.7	6(8)	186604	9132000	V. Gumbán	30	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Residuos de la jug	
E55	613	58	semgr	24-Ene-02	FS091	40.38.2	6(8)	186604	9131204	V. Gumbán	30	6	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Residuos de la jug	
E56	614	59	semgr	24-Ene-02	FS093	18.5.43.3	4(8)			José Luis Velasco	3	7	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Residuos de la jug	
E57	615	60	semgr	24-Ene-02	FS094	41.48	8(8)			José Luis Velasco	3	7	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/09/2002	EA23	Residuos de la jug	
E58	616	61	semgr	24-Ene-02	FS095	52.51.13	14(8)			José Luis Velasco	3	7	2002	2002	juvent	AD1	Sexo Aguardado	14/0			

Especie	Item catalogue	Item Name	Table	Fech_Inv	Numero	LCC	Peso (kg)	Lot	Long	Colaborador	Fecha de recolección	Hu. mas	Site colecta	temporal	Estado	Site	Fecha entrega	Apoyante	registro control de ADN mt	Observaciones
E1	646	3	atropa	14-Nov-02	FS 203	32.0	4000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	647	4	atropa	14-Nov-02	FS 204	29.0	2500				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	648	5	atropa	14-Nov-02	FS 205	29.0	2000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	649	8	atropa	14-Nov-02	FS 206	34.0	8000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	650	7	atropa	14-Nov-02	FS 207	27	1900				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	651	8	atropa	14-Nov-02	FS 208	28	4500				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	652	9	atropa	14-Nov-02	FS 209	44	8000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	653	10	atropa	14-Nov-02	FS 210	35.0	3000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	654	11	atropa	14-Nov-02	FS 211	35	2000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	655	12	atropa	14-Nov-02	FS 212	43	2200				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	656	13	atropa	14-Nov-02	FS 213	50	11000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	657	14	atropa	14-Nov-02	FS 214	39.0	6000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	658	15	atropa	14-Nov-02	FS 215	48	11000				17	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	01/03/2003			
E1	659	16	atropa	14-Nov-02	FS 216	37.1	3200				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	01/03/2003			
E1	660	17	atropa	14-Nov-02	FS 217	37	2200				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	01/03/2003			
E1	661	18	atropa	14-Nov-02	FS 218	37.7	3500				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	01/03/2003			
E1	662	18	atropa	14-Nov-02	FS 219	35.7	4500				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	13/10/2002			Ferns no AG2
E1	663	20	atropa	14-Nov-02	FS 221	30	2700				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	13/10/2002			Ferns no AG2
E1	664	21	atropa	14-Nov-02	FS 222	39	2600				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	13/10/2002			Ferns no AG2
E1	665	22	atropa	14-Nov-02	FS 223	36	4700				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	13/10/2002			Ferns no AG2
E1	666	23	atropa	14-Nov-02	FS 224	36.6	3000				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	13/10/2002			Ferns no AG2
E1	667	24	atropa	14-Nov-02	FS 225	49.0	13000				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	01/03/2003			
E1	668	25	atropa	14-Nov-02	FS 226	41.0	7000				18	7	2002	2002	juvent	AG2 Chumpan	01/03/2003			
E1	669	26	atropa	14-Nov-02	FS 227	30	5000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	670	27	atropa	14-Nov-02	FS 228	30	4000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	671	28	atropa	14-Nov-02	FS 229	38.2	8000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	672	29	atropa	14-Nov-02	FS 230	38	7000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	673	30	atropa	14-Nov-02	FS 231	34.5	4000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	674	31	atropa	14-Nov-02	FS 232	38	4000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	675	32	atropa	14-Nov-02	FS 233	37.0	7000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	676	33	atropa	14-Nov-02	FS 234	35.0	3000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	677	34	atropa	14-Nov-02	FS 235	27.0	2000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			NA
E1	678	35	atropa	14-Nov-02	FS 236	30	3000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	679	36	atropa	14-Nov-02	FS 237	31	3000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	680	37	atropa	14-Nov-02	FS 238	44	9000				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	681	38	atropa	14-Nov-02	FS 239	36	4500				21	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	682	38	atropa	14-Nov-02	FS 240	31	2000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	683	40	atropa	14-Nov-02	FS 241	29.0	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	684	41	atropa	14-Nov-02	O 171						24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	685	42	atropa	14-Nov-02	FS 242	37	4000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	686	43	atropa	14-Nov-02	FS 243	37.0	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			
E1	687	44	atropa	14-Nov-02	FS 244	34.0	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	688	45	atropa	14-Nov-02	FS 245	37	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	689	46	atropa	14-Nov-02	FS 246	33.0	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			AG2 control sobre muestra DNA in hoy que el otro para PCA
E1	690	47	atropa	14-Nov-02	FS 247	40.0	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	691	48	atropa	14-Nov-02	FS 248	38	3000				24	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	16/03/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	692	51	atropa	14-Nov-02	FS 251	40	8000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	693	51	atropa	14-Nov-02	FS 252	42.0	7000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			AG2 control sobre muestra DNA in hoy que el otro para PCA
E1	694	52	atropa	14-Nov-02	FS 253	41.0	8000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	695	54	atropa	14-Nov-02	FS 254	50.0	13000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			AG2 control sobre muestra DNA in hoy que el otro para PCA
E1	696	55	atropa	14-Nov-02	FS 255	34	10000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	697	55	atropa	14-Nov-02	FS 256	41	8000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	698	56	atropa	14-Nov-02	FS 257	39	8000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			AG2 control sobre muestra DNA in hoy que el otro para PCA
E1	699	57	atropa	14-Nov-02	FS 258	41.0	8000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	700	58	atropa	14-Nov-02	FS 259	37.0	8000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	701	60	atropa	14-Nov-02	FS 260	50.0	10000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	702	61	atropa	14-Nov-02	FS 261	50	10000				28	7	2002	2002	juvent	AG2 Punta Kan	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	703	62	atropa	14-Nov-02	FS 262	41.0	8000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	704	63	atropa	14-Nov-02	FS 263	37.0	8000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	705	64	atropa	14-Nov-02	FS 264	41	7000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	706	65	atropa	14-Nov-02	FS 265	42	8000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	707	66	atropa	14-Nov-02	FS 266	37.0	8000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	708	67	atropa	14-Nov-02	FS 267	43	8000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	709	68	atropa	14-Nov-02	FS 268	44	10000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			AG2 control sobre muestra DNA in hoy que el otro para PCA
E1	710	69	atropa	14-Nov-02	FS 269	46.0	13000				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	711	70	atropa	14-Nov-02	FS 270	51	13				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	712	71	atropa	14-Nov-02	FS 271	51	13				27	7	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	713	72	atropa	14-Nov-02	FS 272	50	40				26	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	714	73	atropa	14-Nov-02	FS 273	47	50				26	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	715	74	atropa	14-Nov-02	FS 274	48	10				25	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	716	75	atropa	14-Nov-02	FS 275	47	10				24	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	717	76	atropa	14-Nov-02	FS 276	47	10				24	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	718	77	atropa	14-Nov-02	FS 277	47	10				24	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	719	78	atropa	14-Nov-02	FS 278	47	10				24	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	720	79	atropa	14-Nov-02	FS 279	47	10				24	8	2002	2002	juvent	AG2 Salomón	24/02/2003			Ferns no AG2 PCA
E1	721	80	atropa																	

Fecha	H	M	S	Lat	Long	Altura	LCC	Pres. (kg)	Lat	Long	Colectores	Fecha inicio	Fin	Horas	Temperatura	Estado	Sexo	Fecha nacimiento	Registra quien control de ADN es	Observaciones
6	7:50	15	15	21.46442	-89.534	43.3	7.300 g					11	0	2002	2002	juvén	ADN Samartins	09-03-2003	EAG26	Fove no está para PCR
6	7:50	15	15	21.46442	-89.534	32.2	7.300 g					11	0	2002	2002	juvén	ADN Samartins	09-03-2003	EAG27	Fove no está para PCR
6	7:50	15	15	21.46442	-89.534	31.2	7.300 g					11	0	2002	2002	juvén	ADN Samartins	09-03-2003	EAG27	Fove no está para PCR
6	7:50	15	15	21.46442	-89.534	32.1	7.300 g					11	0	2002	2002	juvén	ADN Samartins	09-03-2003	EAG27	Fove no está para PCR
6	7:50	15	15	21.46442	-89.534	31.8						11	0	2002	2002	juvén	ADN Samartins	09-03-2003	EAG27	Fove no está para PCR

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2

**Haplotipos de la región control en sitios de alimentación de tortuga Carey
en la Península de Yucatán, México**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Haplotipos de la región control en sitios de alimentación de tortuga Carey en la Península de Yucatán, México

Especie	Num catálogo	Num Interno	PCR	sitio de muestreo	fecha sec	no. Perez	tipo_purif	primers_sec	primers_PCR	direc_clon	haplotipo region control ADN mit
Ei	559	67	3316	AD1 Isla Aguada	17-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM13 RvaH950	Directa	EA023
Ei	560	187	3355	AD1 Isla Aguada	19-Ago-03		Minelute corte	M13 Fwd 700 / M13 Rvs 800	LCM_m13FH950-m13R	Directa	NA
Ei	561	168	3356	AD1 Isla Aguada	19-Ago-03		Minelute corte	M13 Fwd 700 / M13 Rvs 800	LCM_m13FH950-m13R	Directa	NA
Ei	562	189	3357	AD1 Isla Aguada	19-Ago-03		Minelute corte	M13 Fwd 700 / M13 Rvs 800	LCM_m13FH950-m13R	Directa	NA
Ei	563	190	3358	AD1 Isla Aguada	19-Ago-03		Minelute corte	M13 Fwd 700 / M13 Rvs 800	LCM_m13FH950-m13R	Directa	NA
Ei	564	1	3062	AD1 Isla Aguada	16-Oct-02		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	NA
Ei	564	10	3062	AD1 Isla Aguada	10-Abr-03		QAquick corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	NA
Ei	564	14	3062	AD1 Isla Aguada	Tal		QAquick corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	NA
Ei	565	11	3063	AD1 Isla Aguada	10-Abr-03		QAquick corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023OUPL
Ei	565	16	3063	AD1 Isla Aguada	07-May-03		QAquick corte	T7/SP6	LTE6H950	Clones	EA023
Ei	565	20	3063	AD1 Isla Aguada	13-May-03		QAquick corte	T7/SP6	LTE6H950	Clones	EA023OUPL
Ei	566	72	3304	AD1 Isla Aguada	17-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM13 RvaH950	Directa	EA023
Ei	567	73	3305	AD1 Isla Aguada	17-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM13 RvaH950	Directa	EA029
Ei	567	76	3305	AD1 Isla Aguada	19-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM13 RvaH950	Directa	EA039OUPL
Ei	568	152	4000	AD1 Isla Aguada	12-Ago-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	569	153	4001	AD1 Isla Aguada	12-Ago-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA039
Ei	571	191	3359	AD1 Isla Aguada	19-Ago-03		Minelute corte	M13 Fwd 700 / M13 Rvs 800	LCM_m13FH950-m13R	Directa	NA
Ei	572	22	3096	AD1 Isla Aguada	20-May-03		Minelute corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023Repeat
Ei	572	30	3096	AD1 Isla Aguada	27-May-03		Minelute corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023Repeat-OUPL
Ei	572	38	3096	AD1 Isla Aguada	29-May-03		Minelute corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023Repeat-OUPL
Ei	582	23	3099	AD1 Isla Aguada	20-May-03		Minelute corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	596	2	3287	AD1 Isla Aguada	16-Oct-02		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039OUPL
Ei	596	12	3287	AD1 Isla Aguada	Tal		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039OUPL
Ei	596	82	3287	AD1 Isla Aguada	Perez	2	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	596	18	3288	AD1 Isla Aguada	13-May-03		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039OUPL
Ei	596	83	3288	AD1 Isla Aguada	Perez	3	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	597	19	3289	AD1 Isla Aguada	13-May-03		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023OUPL
Ei	597	31	3289	AD1 Isla Aguada	27-May-03		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023OUPL
Ei	597	37	3289	AD1 Isla Aguada	29-May-03		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023OUPL
Ei	597	84	3289	AD1 Isla Aguada	Perez	4	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	598	15	3090	AD1 Isla Aguada	Tal		QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023OUPL
Ei	598	85	3090	AD1 Isla Aguada	Perez	5	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	598	86	3091	AD1 Isla Aguada	Perez	6	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	603	87	3282	AD1 Isla Aguada	Perez	7	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	604	88	3283	AD1 Isla Aguada	Perez	8	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	605	89	3284	AD1 Isla Aguada	Perez	9	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	608	17	3285	AD1 Isla Aguada	07-May-03		QAquick corte	T7/SP6	LTE6H950	Clones	EA023OUPL
Ei	608	21	3285	AD1 Isla Aguada	13-May-03		QAquick corte	T7/SP6	LTE6H950	Clones	EA023OUPL
Ei	608	100	3285	AD1 Isla Aguada	Perez	10	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	607	101	3105	AD1 Isla Aguada	Perez	11	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	608	121	3286	AD1 Isla Aguada	Perez	31	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	NA
Ei	609	102	3108	AD1 Isla Aguada	Perez	12	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA027
Ei	610	103	3107	AD1 Isla Aguada	Perez	13	QAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	615	136	3343	AD1 Isla Aguada	15-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	618	137	3344	AD1 Isla Aguada	15-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	617	138	3345	AD1 Isla Aguada	15-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	618	140	3346	AD1 Isla Aguada	17-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023OUPL
Ei	618	146	3346	AD1 Isla Aguada	22-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	618	141	3347	AD1 Isla Aguada	17-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023OUPL
Ei	619	147	3347	AD1 Isla Aguada	22-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	620	125	3330	AD1 Isla Aguada	27-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM13 RvaH950	Directa	EA023OUPL
Ei	620	127	3341	AD1 Isla Aguada	27-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM-M13 FWDH950-M13 RVS	Directa	EA023
Ei	621	128	3331	AD1 Isla Aguada	27-Jun-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM13 RvaH950	Directa	EA023
Ei	622	129	3332	AD1 Isla Aguada	10-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA02339
Ei	623	130	3333	AD1 Isla Aguada	10-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	624	131	3334	AD1 Isla Aguada	10-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	629	132	3335	AD1 Isla Aguada	15-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023OUPL
Ei	629	130	3335	AD1 Isla Aguada	17-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023OUPL
Ei	629	145	3335	AD1 Isla Aguada	22-Jul-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	630	154	4002	AD1 Isla Aguada	12-Ago-03		Minelute corte	M13 Reverse 700800	LCM_m13RH950	Directa	EA023

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

95-1

Haplotipos de la región control en sitios de alimentación de tortuga Carey en la Península de Yucatán, México

Especie	Num catálogo	Num interno	PCR	sitio de muestreo	fecha sec	no. Perez	tipo_purif	primers_sec	primers_PCR	direc_sion	haplotipo region control ADN mit
Ei	631	155	4003	A01 Isla Aguada	12-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	635	128	3342	A01 Isla Aguada	27-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM M13 FWOH950A13 RVS	Directa	EA039
Ei	636	142	3348	A01 Isla Aguada	17-Jul-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA039?
Ei	637	143	3349	A01 Isla Aguada	17-Jul-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	638	148	3351	A01 Isla Aguada	12-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	638	160	3359	A01 Isla Aguada	14-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	639	149	3352	A01 Isla Aguada	12-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	640	150	3353	A01 Isla Aguada	12-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	641	181	3370	A01 Isla Aguada	14-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	642	151	3354	A01 Isla Aguada	12-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	643	144	3350	A01 Isla Aguada	17-Jul-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	644	214	4064	A02 Punta Xen	28-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	645	104	3141	A02 Punta Xen	Perez	14	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	646	41	3142	A02 Punta Xen	03-Jun-03		Minuette corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	646	133	3303	A02 Punta Xen	15-Jul-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	647	105	3143	A02 Punta Xen	Perez	15	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	648	42	3144	A02 Punta Xen	03-Jun-03		Minuette corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	648	134	3303	A02 Punta Xen	15-Jul-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	648	215	4045	A02 Punta Xen	28-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	649	79	3197	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	649	108	3145	A02 Punta Xen	Perez	16	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	650	80	3318	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	650	107	3146	A02 Punta Xen	Perez	17	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	651	81	3319	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA039/OUPL
Ei	651	88	3319	A02 Punta Xen	24-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA039
Ei	651	128	3147	A02 Punta Xen	Perez	18	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039/OUPL
Ei	652	82	3320	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	652	109	3148	A02 Punta Xen	Perez	19	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	653	83	3321	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	653	89	3321	A02 Punta Xen	24-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023
Ei	653	110	3149	A02 Punta Xen	Perez	20	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	654	84	3322	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA039/OUPL
Ei	654	80	3322	A02 Punta Xen	24-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA039/OUPL
Ei	654	111	3150	A02 Punta Xen	Perez	21	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	655	85	3323	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	655	112	3151	A02 Punta Xen	Perez	22	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	656	86	3324	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	656	113	3152	A02 Punta Xen	Perez	23	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	657	87	3325	A02 Punta Xen	18-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA039/OUPL
Ei	657	114	3153	A02 Punta Xen	Perez	24	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	658	115	3154	A02 Punta Xen	Perez	25	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA039
Ei	658	122	3326	A02 Punta Xen	27-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA039/OUPL
Ei	659	117	3156	A03 Chantien	Perez	27	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	659	123	3327	A03 Chantien	27-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	660	118	3156	A03 Chantien	Perez	28	OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	660	124	3328	A03 Chantien	27-Jun-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM13 R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	661	204	4036	A03 Chantien	28-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	662	182	4036	A03 Chantien	21-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	663	205	4037	A03 Chantien	28-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA039
Ei	664	4	3223	A03 Chantien	11-Feb-03		OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	664	187	4031	A03 Chantien	21-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	664	217	4031	A03 Chantien	28-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	665	208	4038	A03 Chantien	28-Ago-03		Minuette corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13R4H950	Directa	EA023
Ei	666	3	3178	A03 Chantien	11-Feb-03		OUAquick corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	666	5	3178	A03 Chantien	03-Abr-03		OUAquick corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	666	6	3178	A03 Chantien	03-Abr-03		Jayvee P.	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	666	7	3178	A03 Chantien	03-Abr-03		Evo Y Toal	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	666	8	3178	A03 Chantien	03-Abr-03		Dobie	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	666	9	3178	A03 Chantien	03-Abr-03		OUAquick	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL
Ei	666	13	3178	A03 Chantien	Tail		OUAquick corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023/OUPL

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

95-2

Haplotipos de la región control en sitios de alimentación de tortuga Carey en la Península de Yucatán, México

Especie	Num catalogo	Num Interno	PCR	sitio de muestreo	fecha sec	no. Perez	tipo_purif	primers_sec	primers_PCR	direc_clon	haplotipo region control ADN mt
Ei	667	43	3157	A03 Chenkan	03-Jun-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023 DUPL
Ei	667	135	3329	A03 Chenkan	15-Jul-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	668	44	3156	A03 Chenkan	03-Jun-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023 DUPL
Ei	668	209	4039	A03 Chenkan	28-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	668	216	4039	A03 Chenkan	10-Sep-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	669	210	4040	A03 Chenkan	26/08/2003/7		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	669	219	4040	A03 Chenkan	10-Sep-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	670	218	4046	A02 Punta Kan	28-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	671	39	3053	A02 Punta Kan	03-Jun-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA021 DUPL
Ei	671	74	3306	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA021
Ei	672	78	3307	A02 Punta Kan	19-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	673	40	3055	A02 Punta Kan	03-Jun-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA022 DUPL
Ei	673	68	3308	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA022
Ei	674	69	3309	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	674	75	3309	A02 Punta Kan	19-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	674	91	3057	A02 Punta Kan	Perez	1	Q/Uajach	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	675	70	3310	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	676	162	3371	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	677	163	3372	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	NA
Ei	678	71	3311	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA001
Ei	679	184	3373	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	680	165	3374	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	681	64	3313	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	681	118	3163	A02 Punta Kan	Perez	28	Q/Uajach	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	682	186	3375	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	683	34	3164	A02 Punta Kan	29-May-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023 DUPL
Ei	683	65	3314	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	684	86	3315	A02 Punta Kan	17-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA001 DUPL
Ei	684	77	3315	A02 Punta Kan	19-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA001
Ei	684*	119	3186	A02 Punta Kan	Perez	29	Q/Uajach	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	685	156	4015	A02 Punta Kan	12-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA029
Ei	686	30	3167	A02 Punta Kan	29-May-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	NA
Ei	686	167	3376	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	687	120	3168	A02 Punta Kan	Perez	30	Q/Uajach	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	688	170	4016	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	688	183	4016	A02 Punta Kan	19-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	688	199	4016	A02 Punta Kan	21-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	689	171	4217	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	689	184	4217	A02 Punta Kan	19-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	690	200	4217	A02 Punta Kan	26-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	690	172	4018	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	691	173	4019	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	692	174	4020	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	692	185	4020	A02 Punta Kan	19-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	693	29	3170	A02 Punta Kan	27-May-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	694	30	3180	A02 Punta Kan	27-May-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023
Ei	695	173	4021	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	696	178	4022	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	697	177	4023	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	698	179	4024	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	699	179	4025	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	700	30	3173	A02 Punta Kan	29-May-03		Mínulatu corte	LTE6H950	LTE6H950	Directa	EA023 DUPL
Ei	700	108	3377	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	701	180	4010	A02 Punta Kan	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	702	62	3180	A02 Punta Kan	12-Jun-03		Mínulatu SN corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	702	108	3378	A02 Punta Kan	14-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	703	63	3191	AD1 Sababouy	12-Jun-03		Mínulatu SN corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023 DUPL
Ei	703	181	4011	AD1 Sababouy	15-Ago-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	704	56	3192	AD1 Sababouy	12-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA024
Ei	705	57	3193	AD1 Sababouy	12-Jun-03		Mínulatu corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

95-3

Haplotipos de la región control en sitios de alimentación de tortuga Carey en la Península de Yucatán, México

Especie	Num catálogo	Num interno	PCR	sitio de muestreo	fecha sec	no. Perez	tipo_puff	primers_sec	primers_PCR	direc_clon	haplotipo region control ADN mit
Ei	706	58	3194	ADM Sabancuy	12-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA029
Ei	707	59	3195	ADM Sabancuy	12-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023/DUPL
Ei	707	186	4012	ADM Sabancuy	19-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	708	60	3196	ADM Sabancuy	12-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	709	24	3197	ADM Sabancuy	22-May-03		Mínimale corte	M13 Fwd 700	LCM13H959	Directa	EA023/DUPL
Ei	709	25	3197	ADM Sabancuy	22-May-03		Mínimale corte	M13 Fwd 700 / M13 Rvs 800	LCM13H950/M13	Directa	EA023/DUPL
Ei	709	26	3197	ADM Sabancuy	22-May-03		Mínimale corte	M13 Fwd 700	LCM13 RvH950	Directa	EA023/DUPL
Ei	709	27	3197	ADM Sabancuy	22-May-03		Mínimale corte	1.7E6H950	LTE6H950	Directa	EA023/DUPL
Ei	709	32	3197	ADM Sabancuy	27-May-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13H959	Directa	EA023/DUPL
Ei	709	33	3197	ADM Sabancuy	27-May-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	710	61	3198	ADM Sabancuy	12-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023/DUPL
Ei	710	182	4013	ADM Sabancuy	15-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	711	157	3366	ADM Sabancuy	14-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	712	158	3367	ADM Sabancuy	14-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	713	193	4027	ADM Sabancuy	21-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	714	159	3368	ADM Sabancuy	14-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	715	49	3203	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	716	194	4028	ADM Sabancuy	21-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023/DUPL
Ei	716	207	4028	ADM Sabancuy	25-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	717	195	4029	ADM Sabancuy	21-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	NA
Ei	717	208	4029	ADM Sabancuy	26-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	NA
Ei	718	196	4030	ADM Sabancuy	21-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	NA
Ei	718	211	4041	ADM Sabancuy	28-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	720	212	4042	ADM Sabancuy	28-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	721	50	3209	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	722	213	4043	ADM Sabancuy	28-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	723	198	4032	ADM Sabancuy	21-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	NA
Ei	724	201	4033	ADM Sabancuy	28-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	725	202	4034	ADM Sabancuy	28-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	726	203	4035	ADM Sabancuy	28-Ago-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM_m13RH950	Directa	EA023
Ei	727	51	3210	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	728	52	3216	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	728	45	3217	ADM Sabancuy	05-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	730	46	3218	ADM Sabancuy	05-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	731	47	3219	ADM Sabancuy	05-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	732	48	3220	ADM Sabancuy	05-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	733	53	3221	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023
Ei	734	54	3222	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023/DUPL
Ei	734	55	3222	ADM Sabancuy	10-Jun-03		Mínimale corte	M13 Reverse 700900	LCM13 RvH950	Directa	EA023

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

95-4

ANEXO 3

Alineación de haplotipos de la región control en sitios de alimentación de tortuga Carey en la Península de Yucatán, México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

EiA039_308 : 40 * 760 * 78 : 779
EiA023_308 : [REDACTED] : 779
EiA024_319 : [REDACTED] : 779
EiA022_314 : [REDACTED] : 779
EiA001_330 : [REDACTED] : 779
TATACTTTTTAGTTAAACCCCCCACCCTAAACTAACA

0
EiA039_308 : [REDACTED] : 784
EiA023_308 : [REDACTED] : 784
EiA024_319 : [REDACTED] : 784
EiA022_314 : [REDACTED] : 784
EiA001_330 : [REDACTED] : 784
TCATG

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN