

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS**

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y PATERNIDAD MÚLTIPLE DE LA  
TORTUGA VERDE DEL PACÍFICO ORIENTAL *Chelonia mydas*  
(LINNAEUS 1758)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. OMAR CHASSIN NORIA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA**

**MORELIA, MICHOACÁN**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Para mi princesa

Que siempre preferiré una flor

Siendo bengala en mi vida, siempre

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
Introducción general .....	3
Invasión del medio marino por las tortugas marinas.....	4
Clasificación de las tortugas marinas: controversia en el género <i>Chelonia</i> .....	7
Estado actual de la tortuga verde del Pacífico oriental .....	10
CAPÍTULO II.....	12
Conservation genetics of the east Pacific green turtle ( <i>Chelonia     mydas</i> ) in Michoacán, México. ....	12
Abstract .....	13
Key words .....	13
Abbreviations .....	14
Introduction .....	15
Materials and Methods .....	17
Sampling and laboratory procedures .....	18
Data analysis .....	20
Results .....	22
Estimates of effective population size .....	24
Discussion.....	25
Genetic structure.....	28
Effective population size .....	29
Conservation Implications.....	31
Acknowledgements .....	32

References .....	33
CAPÍTULO III.....	50
Sistema de apareamiento de la tortuga verde del Pacífico oriental .....	50
Introducción.....	50
Sistemas de apareamiento .....	51
Herramientas moleculares y sistemas de apareamiento .....	51
Ciclo de vida de las tortugas marinas .....	53
Sistema de apareamiento en tortugas marinas .....	55
Herramientas moleculares y sistemas de apareamiento en tortugas marinas .....	57
Microsatélites .....	58
Análisis estadístico de los microsatélites en el estudio de sistemas de apareamiento.....	60
Escenarios posibles de sistemas de apareamiento en la tortuga verde del Pacífico oriental .....	61
Objetivo general .....	65
Objetivos particulares .....	65
Hipótesis .....	65
Materiales y Métodos .....	66
Playa Colola.....	66
Material biológico .....	66
Colecta de muestras .....	67
Extracción de DNA.....	68
Amplificación de microsatélites.....	69

Análisis estadísticos.....	71
Determinación del tamaño mínimo de muestra necesario para detectar la contribución de n genotipos paternos .....	72
Estimación de número de progenitores involucrados en la progenie.....	73
Resultados .....	75
Muestras obtenidas.....	75
Probabilidad de detección de paternidad múltiple .....	76
Estimación del tamaño de muestra mínimo por nido para detectar la contribución genética de machos múltiples.....	76
Frecuencia de paternidad múltiple en la tortuga verde del Pacífico oriental .....	78
Discusión.....	84
Análisis estadísticos.....	84
Tamaño de muestra necesario para detectar paternidad múltiple .....	85
Escenarios posibles de sistemas de apareamiento para tortuga verde del Pacífico oriental .....	85
Diferencias en la frecuencia de paternidad múltiple .....	87
Procesos asociados a los patrones observados de paternidad múltiple .....	89
Paternidad múltiple de la tortuga verde del Pacífico oriental vs. otras tortugas marinas.....	93
CONCLUSIONES .....	98

Capitulo I .....	98
Capitulo II .....	99
LITERATURA CITADA.....	102
APÉNDICE I .....	113
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	113
Tinción con plata.....	114

---

## RESUMEN

La tortuga verde del Pacífico oriental (TVPO) es una población más de la tortuga verde (*Chelonia mydas*), que tiene sus principales playas de anidación continental en el estado de Michoacán, México. Esta población ha sufrido una reducción de más del 90 % de su tamaño original en la década de los sesentas. En el presente trabajo (Capítulo II) se determinaron los valores de diversidad genética de las principales playas de anidación continentales de la tortuga verde del Pacífico oriental, con la finalidad de evaluar si existe evidencia de una reducción en los valores de diversidad genética causada por la reducción del tamaño poblacional sufrido por estas poblaciones en las décadas pasadas. Para este fin se emplearon secuencias nucleotídicas de la región control del mtDNA y 3 loci de microsatélites nucleares. Los resultados obtenidos sugieren que a pesar de la drástica reducción en el tamaño poblacional de la TVPO de Michoacán, no se evidencia una pérdida significativa de diversidad genética. Con los mismos marcadores se demuestra que las colonias reproductoras de TVPO que anidan en Michoacán deben considerarse como una sola unidad de manejo, con un tamaño efectivo de población histórico ( $N_{ef}$  entre 1,900 a 2,300) suficiente para garantizar la viabilidad de esta especie.

El sistema de apareamiento etológico en las poblaciones de TVPO de Michoacán sugiere un sistema poliándrico. En este trabajo (Capítulo III) se determinó la frecuencia de paternidad múltiple empleando 4 loci de microsatélites nucleares altamente polimórficos, que han demostrado tener una alta capacidad para detectar paternidad múltiple. A partir de las frecuencias alélicas



---

poblacionales se realizaron simulaciones para establecer el tamaño de muestra mínimo necesario para detectar la contribución de hasta cinco machos para fertilizar los huevos de un nido, reduciendo considerablemente el costo de este trabajo. En el 75% de los nidos analizados se detectó la presencia de paternidad múltiple evidenciándose congruencia entre la conducta de apareamiento y la frecuencia de paternidad múltiple. Finalmente se discuten posibles causas de la variación en la frecuencia de paternidad múltiple entre tortugas marinas.

---

## CAPÍTULO I

### *Introducción general*

Las tortugas marinas han sido para la humanidad criaturas carismáticas. No es casualidad que en las culturas ancestrales se encuentren frecuentes elementos sobre estos organismos, haciendo referencia a su valor como recurso y como valor cultural; estas referencias se acentúan particularmente para los seres humanos que han tenido una estrecha relación con los océanos tropicales.

Más recientemente las tortugas adquirieron un valor especial como recurso, que proveía un suplemento de proteínas de origen animal de fácil acceso, asociándose además con valores culturales agregados a sus derivados (valor afrodisíaco o medicinal), lo que aunado al desarrollo de vías de comunicación que acercaron los productos derivados de tortugas marinas a las grandes concentraciones de seres humanos, generó tras unas pocas décadas de explotación intensa, una drástica disminución de las poblaciones de tortugas en el mundo, lo que activó señales de alerta que derivaron en la inclusión de todas las especies de tortugas marinas en las listas de especies en peligro de extinción (CITES 2000).

El establecimiento de la amenaza de extinción de estas especies fue lo que atrajo en gran medida, el interés de los biólogos sobre este recurso, incrementándose considerablemente el conocimiento sobre la biología de estos organismos, en las últimas cuatro décadas.

---

Este interés, aunado al acceso del público en general a la información sobre la disminución de los tamaños poblacionales de tortugas marinas, generó una simpatía considerable tanto entre el público en general, entre los investigadores de las ciencias naturales y más recientemente entre los investigadores de las ciencias sociales.

De esta interacción se generó una comunidad de seres humanos interesados en las tortugas marinas desde distintas perspectivas. Algunos se interesaron por las actividades de conservación sin ser estrictos investigadores de las ciencias naturales y la comunidad académica internacional empezó el descubrimiento del valor de las tortugas marinas como modelos de estudio biológico de gran relevancia.

#### *Invasión del medio marino por las tortugas marinas*

Las tortugas marinas son reptiles de origen terrestre que invadieron el medio marino en el Jurásico (hace 195 millones de años). En el Cretácico (hace 140 millones de años) existieron cuatro familias de tortugas marinas (*Toxochelydae*, *Protostegidae*, *Cheloniidae* y *Dermochelydae*), de las cuales sólo las dos últimas sobrevivieron hasta el presente (Lutz y Musick, 1997).

A pesar de lo antiguo del proceso de invasión del medio marino, estos organismos no han logrado hasta la fecha la independencia total del medio terrestre, que es en donde tradicionalmente donde se concentraron la mayoría de las interacciones con seres humanos, al menos hasta el surgimiento de las pesquerías industriales, que son en la actualidad una de las actividades que ejerce mayor presión sobre este recurso.

---

Las tortugas marinas como modelo de estudio, ofrecen numerosas características que las hacen *a priori* un grupo particularmente interesante. El proceso de evolución de la invasión del medio marino sometió a estos organismos a un ambiente lleno de retos desde el punto de vista anatómico, fisiológico y ecológico.

Las presiones selectivas generaron la modificación de la estructura anatómica básica de las tortugas marinas, para resolver los retos a que fueron sometidas bajo el agua salada. Estas modificaciones se hacen evidentes en sus quirridios que actualmente presentan forma de aletas para permitir una locomoción eficiente. Otra modificación evidente, es la pérdida de la capacidad de ocultar su cabeza en la cavidad constituida por el caparazón y plastrón, característica presente como regla en las tortugas terrestres y dulceacuícolas.

Es notable que la estructura básica de las tortugas marinas puede observarse sin cambios substanciales desde hace más de 100 millones de años, lo que contrasta con la evolución observada en otros vertebrados. Particularmente si consideramos la evolución de los mamíferos, en los últimos 65 millones de años se han generado a partir del linaje de los terápsidos, ancestros de toda la clase mamalia, una impresionante diversidad de formas. Considerando únicamente el tamaño, los mamíferos incluyen a organismos tan pequeños como las musarañas (3 g) hasta los vertebrados más grandes existentes en la actualidad como lo son algunos representantes de los cetáceos (>100 ton). Mientras que en un periodo de tiempo similar, las tortugas marinas han mantenido su estructura básica y tamaño corporal sin modificaciones tan radicales.

---

Las tortugas marinas son los vertebrados ectotermos respiradores de aire que pasan más tiempo en el agua (solo del 3 al 6 % de su tiempo lo pasan en la superficie o en tierra); esto es reflejo de cambios en varios rasgos que permiten a las tortugas de origen terrestre ocupar exitosamente el ambiente marino. Al invadir el ambiente acuático, las tortugas fueron obligadas a realizar actividades bajo el agua (buceo) para la búsqueda de alimento, desplazamiento y reproducción. Durante estas actividades el organismo fue sometido a un ambiente pobre en oxígeno, que dio lugar a una respuesta adaptativa fisiológica, concertada con modificaciones morfológicas y conductuales.

En cuanto a cambios fisiológicos podemos inferir adaptaciones de osmoregulación, al verse sometidas a un ambiente hipertónico, control de temperatura, metabolismo y alimentación. Para ejemplificar solo algunos aspectos que evidencian lo eficiente que ha sido este grupo para invadir el medio marino, me concentraré en el sistema cardiovascular.

Se ha observado que cuando las tortugas bucean el ritmo cardiaco varía, de 20 a 30 pulsaciones por minuto en la superficie, a menos de un latido por minuto durante un buceo prolongado (Lutcavage y Lutz 1997). La disminución en el ritmo cardiaco ha sido identificada en mamíferos acuáticos.

En el golfo de California, Felger (1976) reportó el hallazgo de un grupo de tortugas verdes del Pacífico oriental *C. mydas* (identificadas como *C. agassizii* por el autor de ese trabajo) parcialmente escondidas en la arena. Aparentemente permanecieron por tres meses sin alimentarse ni respirar en aguas a 15 °C, lo que supone una capacidad impresionante de disminución de su metabolismo.

Desde el punto de vista ecológico las tortugas marinas fueron sometidas a interacciones con otros organismos acuáticos, que podían competir de manera exitosa por los recursos, particularmente el alimento. En este sentido se han establecido hipótesis que ponen de manifiesto la evolución de hábitos alimenticios derivados como la herbivoría y espongiivoría (consumo de esponjas marinas) para evitar la competencia con organismos carnívoros (Bowen *et al.* 1993).

#### *Clasificación de las tortugas marinas: controversia en el género Chelonia*

A pesar de ser las tortugas marinas el grupo del orden *Testudines* (que agrupa a las tortugas terrestres y dulceacuícolas también) que ha concentrado por mucho la mayoría de las investigaciones con respecto a otras tortugas, existe actualmente un debate sobre aspectos tan básicos como la clasificación taxonómica de este grupo.

De las tortugas marinas actuales se reconocen dos familias. La familia *Dermochelyidae* está representada por una especie, *Dermochelys coriacea* (tortuga laúd), y la familia *Cheloniidae* que tiene actualmente seis o siete especies vivientes: *Caretta caretta* (tortuga caguama), *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfina), *L. kempii* (tortuga lora), *Natator depressus* (tortuga kikila), *Eretmochelys imbricata* (tortuga carey) y *Chelonia mydas* (tortuga verde o negra). Algunos autores consideran como una séptima especie la tortuga negra *Chelonia agassizii*. Para una revisión de la posición taxonómica de las tortugas marinas ver Bowen *et al.* 1993 y Dutton *et al.* 1996.

Algunos autores sugieren que la tortuga negra, es una especie independiente (*C. agassizii*) (Figuerola y Alvarado 1990; Pritchard 1997), mientras

---

que otros autores sugieren que es una población regional o una subespecie (*C. mydas* o *C. mydas agassizii* respectivamente) (Karl y Bowen 1999; Bowen y Karl 2000; Chassin-Noria 2002). La controversia se debe a que existen evidencias a favor y en contra de la asignación de especie para la tortuga negra. A continuación se presenta un resumen de la información disponible a la fecha.

Se ha encontrado que *C. agassizii* y *C. mydas* son especies que ocurren de manera simpátrica en algunas localidades (Islas Galápagos y Nueva Guinea) sin que a la fecha se tenga evidencia de eventos reproductivos entre éstas, por lo que Pritchard (1997) considera que existe aislamiento reproductivo y por consiguiente es válida la existencia *C. agassizii* como especie.

La tortuga negra es diferente en cuanto a forma, tamaño y coloración del caparazón, de acuerdo a un trabajo en el que se comparan tortugas del estado de Michoacán (México, océano Pacífico) y de la playa Tortuguero (Costa Rica, océano Atlántico) (Figueroa y Alvarado 1990).

Kamezaki y Matsui (1995) analizaron medidas craneales en siete playas de anidación, dos del Atlántico y cinco del Pacífico, concluyendo que la diferenciación morfológica que ellos encuentran entre *C. mydas* y *C. agassizii* es suficiente para clasificar a esta última como subespecie, *C. mydas agassizii*.

Bowen *et al.* (1992) analizaron el mtDNA con enzimas de restricción sobre muestras de 15 colonias dentro del área de distribución global del género *Chelonia*, encontrando una clara distinción entre las poblaciones del Indo-Pacífico con respecto a las del Atlántico y Mediterráneo. Sin embargo, no encontraron evidencia, para considerar que la tortuga negra forme un linaje independiente con

---

respecto a las demás tortugas de este género, por lo tanto no apoyaron la asignación de especie independiente.

Karl *et al.* (1992) analizaron genes nucleares de copia única, con enzimas de restricción para evaluar la diferenciación genética entre tortuga negra y verde. En su análisis filogenético no se apoya la asignación de especie para *C. agassizii*.

Dutton *et al.* (1996) secuenciaron dos segmentos mitocondriales de tortuga negra y verde (ND4 y región control) sin que el análisis filogenético demuestre una distinción clara de la tortuga negra con respecto a la tortuga verde.

Karl y Bowen (1999) secuenciaron 1,341 pares de bases de tres loci usados por Karl *et al.* (1992), sin observar que las tortugas negras analizadas formen un grupo monofilético distinto al resto de las *Chelonias*.

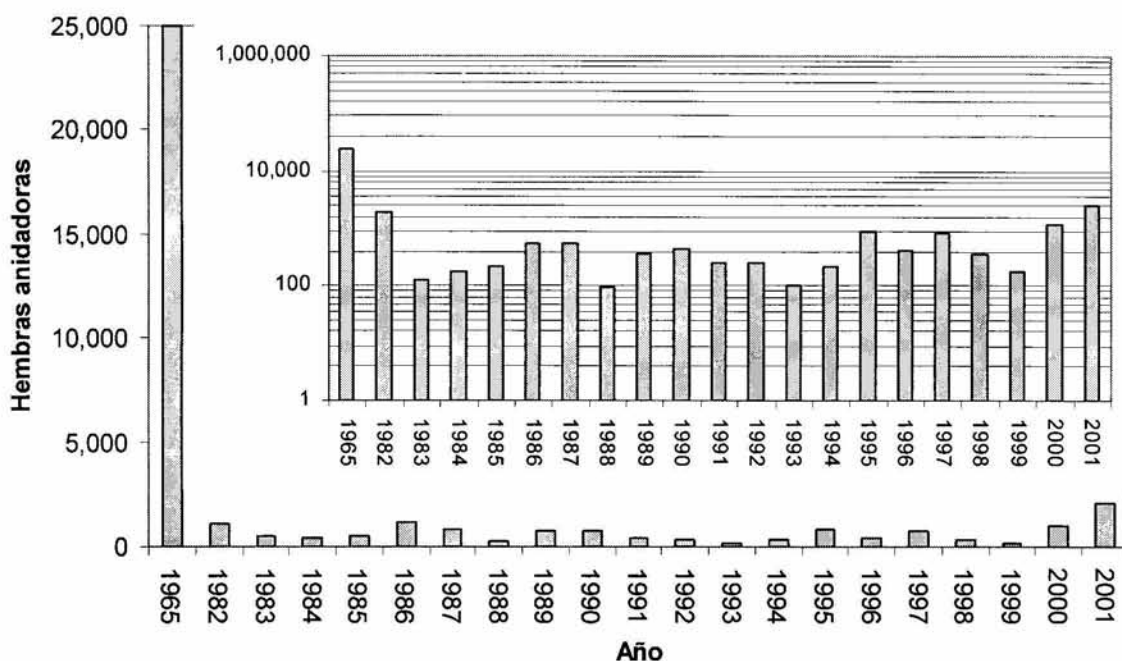
Esta controversia esta inmersa en una controversia sin solución universal en la biología, ¿Qué es una especie? (ver Futuyma 1998). No es posible definir si la TVPO (tortuga verde del Pacífico oriental) constituye una especie si no se acota a que concepto de especie nos estamos refiriendo. Y esta discusión ha estado intocable en la comunidad científica que pretende definir el estatus taxonómico de esta población. En trabajos realizados se discute en detalle esta controversia (Karl y Bowen 1999; Bowen y Karl 2000; Chassin-Noria 2002).

Basados en esta evidencia, en este trabajo se considera a *C. agassizii* como sinonimia de *C. mydas* refiriéndonos específicamente a la población de áreas de anidación en el Pacífico oriental como tortuga verde del Pacífico oriental (TVPO) hasta que un análisis realizado a la luz de nueva información (Ej. morfológica, ecológica, etológica, fisiológica) considerando el área de distribución del género *Chelonia*, modifiquen esta hipótesis.



*Estado actual de la tortuga verde del Pacífico oriental*

Al margen de la controversia taxonómica del género *Chelonia*, es evidente que las presiones de explotación sobre la TVPO han generado una reducción de gran magnitud en su tamaño poblacional (Figura 1.1.) lo que hace imperativo aumentar el conocimiento biológico de esta la misma.



**Figura 1.1.** Gráfica en el que se representa el número de hembras anidadoras estimado en 1965 (Cliffton et al. 1982) y el número de hembras anidadoras observado entre 1982 y 2000, (datos tomados de Delgado 2003). El gráfico más pequeño presenta el número de hembras anidadoras en escala logarítmica para observar más claramente la variación en el número de hembras anidadoras particularmente de 1982 al 2001.

Con el desarrollo de la Biología de la Conservación se ha vuelto de gran importancia conocer los niveles de variación y diferenciación genética, particularmente de las especies amenazadas o en peligro de extinción (Awise 1994; Frankel y Soulé 1981). Desde los años 60 se han realizado análisis de diferenciación y variación genética empleando técnicas moleculares clásicas; sin

embargo, en las dos décadas pasadas, con el desarrollo de nuevas herramientas moleculares, se hizo posible su estudio más detallado (Frankham *et al.* 2002)

## **CAPÍTULO II**

### **Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacán, México.**

Omar Chassin-Noria, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM, Antigua carretera a Patzcuaro 8071, Colonia Ex Hacienda de San Jose de la Huerta, C.P. 58190. Morelia, Michoacán, México, Telephone +52(443) 322 27 04 Fax +52(443)322 27 19, E-mail [chassin@oikos.unam.mx](mailto:chassin@oikos.unam.mx) (correspondence autor).

Alberto Abreu-Grobois, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM, Unidad Academica Mazatlán. A.P. 811 C.P. 82000. Mazatlán, Sinaloa México.

Peter H. Dutton, NOAA-NMFS Southwest Fisheries Science Center 8604 La Jolla Shores Drive. La Jolla CA 92038.

Ken Oyama, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM, Antigua carretera a Pátzcuaro 8071, Colonia Ex Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190. Morelia, Michoacán, México.

---

**Abstract**

The main continental nesting rookeries of the east Pacific green turtle (EPGT), *Chelonia mydas*, on the Michoacán (México) coast suffered drastic population declines following intense exploitation in the 1960s-1970s with annual abundance of nesting females plummeting from about 25,000 to an average of about 1,400 between 1982-2001. Analyses of data from three nDNA microsatellite loci and 400 bp mtDNA control region sequences from a total of 123 nesting females sampled from four Michoacán rookeries found no evidence of population sub-structuring. The recent order of magnitude reduction in the population size shows no apparent impact on genetic diversity in either control region sequences (overall  $h = 0.48$ ;  $\pi = 0.0036$ ) or microsatellite loci (overall  $N_a = 20.8$ ;  $H_{exp} = 0.895$ ). Our estimates of annual effective female population size ( $N_{ef}$ ; from  $\theta = 2Ne\mu$ ) of  $1.9-2.3 \times 10^3$ , in spite of being an order of magnitude below historical records, appear to be sufficient to allow recovery of this population without significant loss of genetic diversity. These findings highlight the importance of continued conservation to reverse the decline of this population before it becomes vulnerable to genetic erosion.

**Key words**

*Chelonia mydas*, east Pacific green turtle, black turtle, effective population size, genetic structure, genetic diversity, mitochondrial DNA, microsatellites.

## **Abbreviations**

AB- Arenas Blancas, COL- Colola, EPGT- east Pacific green turtle, MAR- Maruata, mtDNA- mitochondrial DNA, nDNA- nuclear DNA, PN- Paso de Noria.

## Introduction

The green turtle, *Chelonia mydas*, is distributed in tropical and subtropical waters and nests on beaches of five continents between latitudes 30°N and 30°S (Marquez, 1990; Hirth, 1997). Females of the species exhibit a strong tendency for natal homing and nest site fidelity (Meylan, Bowen & Avise, 1990; Bowen et al., 1995) that result in significant genetic differentiation among rookeries (Encalada et al., 1996). In the east Pacific the species has nesting sites from the Galápagos Islands (Ecuador) northward to Michoacán and the Revillagigedos Islands (México), where it is known as the east Pacific green turtle (EPGT) or “black turtle” (Pritchard & Mortimer, 1999). These individuals exhibit morphological characteristics that distinguish them from other *C. mydas* (e.g., adult carapace is much darker, domed, and with indented edges above the hind limbs; mature individuals are smaller and the breeding females lay fewer eggs; Hirth, 1997). These meristic features and multivariate morphological analyses have led some authors to consider the EPGT either as a full, separate species, *C. agassizii* (Bocourt, 1868; Pritchard, 1999), or a subspecies, *C. m. agassizii* (Marquez, 1990; Kamezaki & Matsui, 1995). However molecular genetic studies, which have demonstrated their utility in resolving major taxonomic and evolutionary controversies in marine turtles (Bowen, Meylan & Avise, 1991; Bowen, Nelson & Avise, 1993), have instead indicated the EPGT to be simply a regional, melanistic population within the Pacific clade of *C. mydas* (Dutton et al., 1996; Karl & Bowen, 1999; Chassin-Noria, 2002).

---

The largest EPGT continental rookery (surpassed in size only in recent times by the population nesting in the Galápagos Islands; Hurtado, 1984; Zarate et al., in press) nests on a small number of beaches in the State of Michoacán (México). However, these turtles have exhibited steep population declines due to commercial over-exploitation in the 1960's. The number of females nesting per year in the whole of Michoacán has collapsed from about 25,000 just prior to the 1970s (Cliffton, Cornejo & Felger, 1982), to an average of around 1,400 between 1982-2001 (recalculated from Delgado & Alvarado, 2001); a period of roughly 30 years or about a single green turtle generation (Zug et al., 2002). By any standard, these trends indicate a critical condition which has lingered due to persistent take of animals at their foraging grounds in NW México (Gardner & Nichols, 2001). The persistent endangered status of the Pacific México nesting populations contrasts sharply with the status of *Chelonia* populations on the Atlantic coast of México, where recent population increases (Arenas, Sarti & Ulloa, 2001) suggest positive results from similar multi-decade conservation efforts in that area.

Previous molecular genetic studies involving the EPGT have focused on phylogeography and taxonomy and were based on small sample sizes; a single individual from the Michoacán, México rookery (Dutton et al., 1996), and five individuals from Galápagos, Ecuador (Karl & Bowen, 1999). Here we present results from extensive sampling of the four EPGT rookeries that remain along discontinuous beaches in Michoacán (México) and analyze the distribution of genetic variation within two types of molecular markers with complementary features. The mitochondrial DNA (mtDNA) control region, being maternally inherited, is characterized by a rapid rate of evolution and a higher proportion of genetic variance among populations than for bi-

---

parentally inherited markers (Cann, Stoneking & Wilson, 1987). This molecular tool has been extensively used to investigate molecular systematics and population genetic differentiation in marine turtles (Moritz, Dowling & Brown, 1987; Norman, Moritz & Limpus, 1994; Avise, 2000), and its broad application in other sea turtle species (e.g. Norman, Moritz & Limpus, 1994; Encalada et al., 1996; Bowen et al., 1998; Dutton et al., 1999) allows for comparisons of genetic attributes with previous studies. Microsatellites, on the other hand, are a highly polymorphic class of nuclear DNA (nDNA) markers which have been applied in sea turtles to study identity and paternity (FitzSimmons, 1998; Crim et al., 2002; Dutton, 1996a), regional geographic structuring and male-biased gene flow (FitzSimmons et al., 1997).

This study extends the geographic, numeric and genetic coverage of surveys on the EPGT nesting in Michoacán, to (1) evaluate levels of genetic diversity and, by comparing with analogous studies in other marine turtle species, detect potential evidence that population declines have caused an erosion of genetic variability in the EPGT, (2) study the extent of genetic structuring among rookeries, and (3) use the genetic data to estimate historical effective population sizes ( $N_e$ ) in order to evaluate the extent to which population crashes have affected the abundances of breeding populations.

## **Materials and Methods**



---

*Sampling and laboratory procedures*

A total of 123 samples were obtained from females nesting at four beaches in Michoacán, México (Figure 1) - Colola (COL, n = 70), Maruata (MAR, n = 19), Paso de Noria (PN, n = 15), and Arenas Blancas (AB, n = 19) - during two breeding seasons (September 1996 - January 1997 and September 1997 - January 1998). Differences in sample sizes are due to limitations in availability, particularly from PN and AB, where fewer than 100 females nest every season. When nesting females were found, blood samples (3 ml) were extracted from the dorsal cervical sinus immediately after egg laying (Owens & Ruiz, 1980). After sampling, a Monel tag was applied to the right front flipper for identification to avoid duplicate sampling. Blood was preserved in 1-5 ml lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM EDTA pH 8; 10 mM NaCl; 1.0% (w/v) SDS; Dutton, 1996b). When the nesting female was not observed and only its nest was available, a single dead hatchling was collected from each nest. Muscle biopsies of dead hatchlings (~3 mm<sup>3</sup>) were suspended in "SED" buffer (20 % DMSO, 250 mM EDTA, saturated NaCl, pH 7.5-8). All nest samples were taken within an eleven day period to avoid resampling females that commonly nest 2-4 times per season in cycles of approximately 14-days (Hirth, 1997).

We extracted genomic DNA using the proteinase K digestion protocol of Maniatis, Fritsch & Sambrook (1982) with the modifications described by FitzSimmons (1997). Approximately 20 µl of blood in lysis buffer were incubated in 300 µl buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl and 0.1 % SDS), with proteinase K (final concentration of 1mg/ml) for 1-3 hours at 60°C with occasional tube inversions. DNA was precipitated with ethanol, and resuspended in 50-100 µl H<sub>2</sub>O.

---

For the mtDNA control region we amplified 2  $\mu$ l of template DNA in 25  $\mu$ l reaction volumes (containing 200  $\mu$ M dNTP's, 1.5 mM MgCl, 1  $\mu$ M each primer, 1.5 Units *Taq* polymerase) with 30 PCR cycles (Saiki et al., 1988), using a Perkin-Elmer Inc. thermal cycler with the following protocol: DNA denaturing at 94°C for 1 min, primer annealing at 57°C for 1 min, and primer extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 5 min. LTCM1 and HDCM1 primers (Allard et al., 1994) were used, which amplified a portion of about 550 bp from the 5' end of the region, although sequences were truncated at 400 bp for subsequent analyses to homogenize sequence lengths. Sequences were obtained using an Applied Biosystems Inc. (ABI model 377) automated sequencer, with all variable positions confirmed by comparing sequences from both strands.

PCR conditions for microsatellite amplifications were the same as for the mtDNA control region, except that 10-second steps were used in 35 amplification cycles. Cm3, Cm72, and Cc7 primers (FitzSimmons, 1997) were used for nDNA microsatellite amplification. The PCR products were run on 4% denaturing polyacrylamide electrophoresis gel (44x33x0.04 cm plates) prepared as described by Caetano-Anolles & Gresshoff (1994). Electrophoresis was performed at ~60°C until the bromophenol blue dye marker reached the leading edge of the plates. Electromorphs were silver stained as described by Caetano-Anolles & Gresshoff (1994). A 123 bp marker was included in all gels as size marker in both margins. Allele sizes were determined using Labimage 2.02 (Labsoft Diagnostics AG) software.

---

*Data analysis*

Estimates of haplotype nucleotide compositions and population genetic variation (haplotype,  $h$ , and nucleotide,  $\pi$ , diversities) were derived from aligned (Clustal V; Higgins, Bleasby & Fuchs, 1991) mtDNA haplotypes, using Arlequin 2.0 (Schneider, Roessli & Excoffier, 2000). This program was also used to estimate gene flow values (as  $N_m$ ),  $F_{st}$  values, to perform analyses of molecular variance (AMOVA) and to derive minimum spanning networks.

The mtDNA sequence divergence between populations or haplotypes was quantified using total ( $d_{TOT}$ ) and net (or “corrected”,  $d_{NET}$ ) average number of pairwise differences (Nei, 1987, equations 10.20 and 10.21, respectively). The latter corrects for intrapopulation variation. Published mtDNA control region sequences for Atlantic *Chelonia mydas* (Encalada et al., 1996) and Pacific *C. mydas* (Norman, Moritz & Limpus, 1994) were compared in order to estimate genetic divergence between Pacific and Atlantic *Chelonia*. Since data are not available for all populations, haplotype frequencies were input into the analysis software as  $1/n$ , where  $n$  = number of haplotypes, since all haplotypes are different and none are shared between groups of populations evaluated (following Nei, 1987, p. 276). The Tamura (1992) method for multiple mutations correction was used since this and previous results with *Chelonia* (e.g. Encalada et al., 1996) indicate very high transition:transversion bias ( $\gg 8$ ) and unbalanced base frequency composition with  $A+T \gg G+C$ . All of the above computations were calculated using Arlequin 2.0 (Schneider, Roessli & Excoffier, 2000).

Long-term effective population size of females ( $N_{ef}$ ) was calculated following the approach described by Cummings & Clegg (1998), from estimates of nucleotide

---

polymorphism,  $\pi$ , which is equivalent to  $2N_e\mu$  in haploid systems. The  $\theta$  statistic was estimated using Arlequin 2.0 (Schneider, Roessli & Excoffier, 2000) on the basis of the number of segregating sites in a sequence ( $\theta_S$ ) and the average number of pairwise differences between sequences,  $\pi$  ( $\theta_\pi$ ). To obtain  $N_{ef}$ , a corresponding mutation rate per lineage ( $\mu$ ) for control region sequences was estimated in two steps: (1) using Arlequin to estimate  $d_{NET}$  between published sequences from Atlantic (Encalada et al., 1996; Abreu-Grobois et al., 1996) vs. Pacific *Chelonia* populations (Norman, Moritz & Limpus, 1994; Abreu-Grobois et al., 1996), and (2) calibrating this estimate with the rise of the Panama Isthmus, 3.5 Mya (Coates et al., 1992). In the calculations, time was converted to *Chelonia* generations by assuming a mean of 40 years/generation (an approximation based on an estimate of 30 years for time to maturity by Zug et al. (2002) plus  $\frac{1}{2}$  reproductive longevity of about 20 years, using Pianka (2000 equation, p. 141). In order to compare to recent population values, the  $N_{ef}$  was expressed in terms of nesting females/year by assuming that, on an average, *Chelonia* females nest every 3.0 years (average from data in Hirth, 1997).

Divergence in microsatellite allele frequencies among rookeries was tested by comparing resulting chi-squared values with 10,000 randomized data sets generated by REAP (McElroy et al., 1992), a test performed to compare our results with those of previously published work on *Chelonia* populations (Karl, Bowen & Avise, 1992; FitzSimmons et al., 1997). Deviation from Hardy-Weinberg equilibria were tested with Genepop version 3.3. (Raymond & Russet, 1995),  $F_{st}$  estimations were obtained with Arlequin 2.0 (Schneider, Roessli & Excoffier, 2000), and  $R_{st}$  values with RSTcalc 2.2 (Goodman, 1997).

## Results

As is common in other marine turtle species (Karam, 1997), nucleotide composition of EPGT sequences was heavily biased towards A/T bases (68% relative composition). A total of five 400 base pair haplotypes were detected among the 123 samples amplified for the mtDNA control region (Table 1) which resulted from six polymorphic positions, all transitions, of which only one (position 317) was parsimony-informative. The observed haplotypes are closely related, differing in at most four positions (Figure 2). Haplotypes CMP4 and CMP5 were the most common in all four rookeries, with frequencies >53% and >13% respectively and, in combination, they represent >84% of the individual population's total haplotype complement. The remaining three, CMP7, CMP8 and CMP12, were rare (<20%) and each was only found in single rookeries (Table 1). None of these haplotypes has ever been reported from any *Chelonia* population, although the most important rookeries have already been surveyed (Norman, Moritz & Limpus, 1994; Encalada et al., 1996; P. Dutton et al., in preparation).

Haplotype diversity ( $h$ ) varied from 0.25 (PN) to 0.60 (AB), similar to estimates from other marine turtle species (Table 2). Nucleotide diversity ( $\pi$ ) varied from 0.0018 (PN) to 0.0052 (AB), within the ranges found in other species (Table 2). Global values (obtained by grouping all results) were  $h = 0.48$  and  $\pi = 0.0036$ .

The three microsatellite loci analyzed were highly variable. In order of variability, Cm72 had 53 alleles, Cc7 had 33, and Cm3 had 27 alleles, and intermediate-sized alleles were found at highest frequencies (see Figure 3). Heterozygosity and number of alleles per locus were very high at all rookeries (mean  $H_{obs}$  (overall loci)  $> 0.95$ , and  $H_{exp} > 0.87$ ; the number of alleles varied from 11 to 46) (Table 3). No deviations from Hardy Weinberg equilibrium were found after adjusting for multiple tests ( $n = 12$ ) according to the Bonferroni correction (Rice, 1989). Allele frequency differences among EPGT rookeries were not significant for any of the loci assayed (Cm3:  $\chi^2 = 93.29$ ,  $P = 0.133$ ; Cm72:  $\chi^2 = 173.25$ ,  $P = 0.146$ ; Cc7:  $\chi^2 = 100.71$ ,  $P = 0.349$ ).

The AMOVA results for both the mtDNA sequence and microsatellite data indicate that, respectively, 98.8 and 99.7% of genetic variability resides within rookeries (data not shown). Nonetheless, there is no indication of inbreeding within localities (multilocus  $F_{IS} < 0.09$ ; Table 3).

Estimates of genetic differentiation between the four populations were very low, both from mtDNA sequences and microsatellite data. For mtDNA,  $F_{st}$  ranged from 0.004 to 0.123. The two methods used with the microsatellite data produced similar results:  $F_{st}$  ranged from 0.0012 to 0.0060, and  $R_{st}$  values from negative values (i.e. no genetic differentiation) to 0.024 (Table 4).

The estimated numbers of migrants per generation among localities (in terms of  $N_m$ ) were all  $> 38$  from the microsatellite data. Estimates of  $N_m$  from mtDNA data, with the exception of a low value for the MAR vs PN analysis ( $N_m = 3.6$ ) had values  $> 20$ . Considering the above results and that migration rates ( $N_m$ ) of more than 1-10 allow sufficient gene flow to curtail interpopulational differentiation (Mills & Allendorf, 1996),

---

our results support a view that all rookeries in Michoacán behave as a single population. Thus the populations were pooled for subsequent analyses.

### *Estimates of effective population size*

If a specific mutation rate,  $\mu$ , is assumed, then estimates of  $\theta$  from grouped rookery results can be used to estimate  $N_e$ , the effective population size, for the whole of Michoacán, by using a transformation of the original Watterson (1975) equation  $N_e = \theta / 2\mu$  (for haploid systems such as mtDNA). As female lineages are assayed when working with mtDNA, we can only calculate effective population sizes of females ( $N_{ef}$ ). We estimated  $\mu$  from net genetic distances between published *Chelonia* haplotypes from Pacific (Norman, Moritz & Limpus, 1994) and Atlantic populations (Encalada et al., 1996), calculated using the Tamura (1992) model and Nei (1987) formula 10.21. The haplotypes frequencies were entered as 1/total number of haplotypes for computations as there is no haplotypes overlap among the two groups of populations (following Nei 1987, p. 276), assuming that these two lineages were split by the closing of the Isthmus of Panama (Coates et al., 1992). The resulting mutation rate that we calculated for *Chelonia* (0.62% per MY per lineage) is similar to the values used by Lahanas et al. (1994) of 1.76% per MY per pair of lineages and Encalada et al. (1996) of 1.2 – 2.4% per MY per pair of lineages, and 1.7 - 2.2% per MY per pair lineages (Dutton et al 1999) (equivalent to 0.88% , 0.6 – 1.2% , and 0.88 - 1.1 per MY per lineage, respectively); although we have employed more extensive sequence comparisons. Assuming a generation time of 40 years, based on the estimate in Zug et

---

*al.* (2002) of 30 years to sexual maturity and adding  $\frac{1}{2}$  reproductive longevity of about 20, following Pianka (2000) equations, our results lead to an estimated generational mutation rate per lineage of  $2.48 \times 10^{-7}$  mutations per nucleotide site.

Estimates of  $\theta$  per site combining the five Michoacán EPGT haplotypes, ranged from 0.0028 (based on number of segregating sites,  $S_n$ , from Watterson, 1975) to 0.0034 (based on mean number of pairwise differences,  $\pi$ , from Tajima 1983). These  $\theta$  values were used to approximate  $N_{ef}$  for EPGT females nesting in the whole of Michoacán. From estimates of mutation rate per site per generation of  $2.48 \times 10^{-07}$ ,  $N_{ef}$  was calculated at 5,610 based on  $S_n$  and of 6,800 based on  $\pi$ , equivalent to 1,860 and 2,260 females nesting per season respectively if one assumes EPGT mature females effectively only nest on average every 3.0 years (Hirth, 1997).

## Discussion

Evaluations of genetic diversity are of use to wildlife managers, particularly in cases, such as the EPGT, where there has been a sudden, drastic population decline that may have led to loss of genetic variability. Loss of genetic variability is believed to diminish the ability of populations to adapt or respond to environmental change (Frankel and Soule, 1981; Lacy, 1987). Small populations are most vulnerable to effects of loss of variability as rates are dependent on the effective number of breeders in a population ( $N_e$ ) and time (Crow & Kimura, 1970). Thus, managers place priority on identifying populations that are both small in terms of  $N_e$  and that have recently lost genetic



variability, as these may be more susceptible to demographic and genetic stochasticity (Mills & Smouse, 1994). The Michoacán EPGT has been under these considerations due to fears of potential genetic erosion provoked by the high exploitation rates to which they have been subjected.

The extent of genetic diversity at the mtDNA control region in the Michoacán EPGT rookeries is reflected in a total of five closely related haplotypes, with a typical “star shaped” phylogeny having a central haplotype found at the highest frequency (CMP4) that also represents the most probable ancestral sequences from which remaining sequences, particularly haplotypes CMP7, CMP8, and CMP12, would have recently derived (Figure 2, Table 1). This would probably have occurred within this region (i.e., in relative isolation) since (a) at most four base substitutions (all transitions) exist among Michoacán haplotypes, and (b) the two most common haplotypes (CMP4 and CMP5) are only found in EPGT populations, and all low frequency haplotypes (CMP7, CMP8, and CMP12) have been found exclusively in Michoacán rookeries (P. Dutton et al., in preparation). The assumption of local evolution of the genetic diversity at this locus is critical for the estimation of effective population size in this population (see below).

Nucleotide and gene diversity estimates for the Michoacán rookeries, which are within the range reported for other marine turtles (Lahanas et al., 1994; Bass et al., 1996; Bowen et al., 1998; Encalada et al., 1998), may also provide insight into the demographic history of the population (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2002). While data from a broad suite of populations are necessary to perform this analysis in a thorough fashion, available information from green turtles provides enough background to derive

---

preliminary conclusions for important demographic aspects of the Michoacán population.

First, the haplotype diversity value ( $h = 0.48$ ) is within the high end of the range found in other marine turtles (Table 2) suggesting that this population has not undergone a genetic bottleneck (see also discussion in section on effective population size, below). The history of intense human exploitation of Michoacán EPGT does not appear to have reduced the number of nesting females below levels known to be critical in provoking negative genetic impacts due to bottleneck effects (i.e., population size  $< 20$  according to Glenn, Stephan & Braun 1999; Whitehouse & Harley, 2001).

Second, high genetic diversities, while positively correlated with population size in theory (Soule & Khom, 1989; Frankham, 1996), can also be the result of multiple colonization events, or of immigration by differentiated populations. A comparison of our genetic diversity estimates with those from previous studies allows this to be explored. For example, immigration or genetic admixture, in spite of a general phylopatric behavior of marine turtles, have been used to explain the relatively high values of both haplotype and nucleotide diversity found in some relatively small green turtle rookeries: Polynesia ( $h = 0.44$ ,  $\pi = 0.0027$ , Number of females population = few hundred; Bowen et al., 1992); Aves Island, Venezuela ( $h = 0.25$ ,  $\pi = 0.0053$ ; Number of females population = 300 - 500, Lahanas et al., 1994); and Quintana Roo, México ( $h = 0.82$ ,  $\pi = 0.0057$ ; Number of females population = 100 - 400 Encalada et al., 1996). In all these cases, the high  $\pi$  values respect to the other beaches surveyed on each work, have been interpreted as reflecting historical introgressions by individuals with divergent haplotypes. In the case of the Michoacán rookeries in our study, the relatively low  $\pi$

---

value coupled with relatively high haplotype diversity and the low frequency of three of the five haplotypes found suggest that the three lowest frequency haplotypes were originated from a localized evolutionary process rather than immigration.

Another argument against the existence of a bottleneck is the relatively high genetic diversity in the Michoacán EPGT reflected by the high number of alleles for microstellite loci and with broad frequency distributions (Figure 3). This is particularly the case for Cm72 (with a total of 53 alleles), a locus that has been shown to accumulate site-specific mutations at very high rates (FitzSimmons , 1998). The expected heterozygosities estimated for this locus ( $H_{exp} = 0.80 - 1.00$ ) in Michoacán are comparable to those obtained for Australian green turtle populations ( $H_{exp} = 0.87 - 0.96$ ) (FitzSimmons et al., 1997). These populations have average nesting numbers that range between thousands to tens of thousands of individuals (Limpus et al., 1993), and is considered the biggest green turtle nesting aggregation in the world. This comparison suggests that genetic erosion has not occurred in Michoacán green turtles, despite of the severe population decline.

### *Genetic structure*

Genetic research has revealed extensive population sub-structuring within the geographic ranges of all sea turtle species studied to date (Bowen et al., 1992; Bowen et al., 1994; Encalada et al., 1996; FitzSimmons et al., 1997; Bowen et al., 1998; Dutton et al., 1999), confirming the theory of natal homing by females (Meylan, Bowen & Avise, 1990; Allard et al., 1994) and to some extent also for males (FitzSimmons et al., 1997). However, these studies have been global in scale (Bowen et al., 1992) or covered

---

extensive geographic ranges (> 1,500 km) (e.g., Encalada et al., 1996; FitzSimmons et al., 1997). Our failure to detect genetic sub-structure of female lineages on a finer scale (45 km between the extreme rookeries, COL and AB) suggests that the precision of natal homing operates over larger geographic scales, at least on evolutionary time scales that would be reflected at the level of the genetic markers we used, and that the Michoacan rookeries comprise one genetic stock for management purposes. These results should be interpreted with caution and in conjunction with other lines of evidence, since genetic results may fail to detect more subtle demographic isolation between populations (Taylor & Dizon, 1996). However, the available tagging studies demonstrate that some females nest both in COL and MAR (J. Alvarado, personal communication). This would be compatible with our genetic results and would further corroborate the notion of Michoacán rookeries comprising a cohesive management unit.

### *Effective population size*

The effective population size ( $N_e$ , harmonic mean size of the breeding population over a historic timescale) is one of the most valuable parameters for management. Yet, its estimation presents practical obstacles when attempting to determine it using a purely demographic approach as it is almost impossible to identify the numbers of breeders, and the value is most sensitive to differential breeding variances either between sexes or across breeding seasons. It can, however, be approximated using genetic diversity information (e.g. Cummings & Clegg (1998) for wild barley; Lahanas et al. (1994) for *Chelonia* populations; Dutton et al. (1999) for *Dermochelys* ).

---

Our estimates of between 1,900 and 2,300 breeding females per season ( $N_{ef}$ ) are about 1/10 the population size reported in the late 1960s of 25,000 (Cliffon, Cornejo & Felger, 1982) but the same order of magnitude of current census sizes, estimated to be around 1,400 females per year (Delgado & Alvarado, 2001) calculated between 1997 to 2001 for Colola and assuming that nesting abundance on this beach represents a 60% of whole of Michoacán (Delgado & Alvarado, 2001). While caution should be exerted when reaching conclusions based on genetic diversity-based  $N_e$  calculations which rely on a number of assumptions, experience with other species do provide useful insights. For example, even in shellfish and widely distributed marine fish with extremely high fecundities,  $N_e$ 's estimated in this manner are typically an order of magnitude lower than present day population sizes (Grant & Bowen, 1998). The proportion of  $N_e$  values from Michoacán relative to past population sizes is very similar to the results found in *Dermochelys* (Dutton et al., 1999) and may be a general pattern for slow-growing, late maturing species. Nevertheless, although further population declines in the Michoacán green turtle, if unchecked across several generations, could lead to critically small effective population sizes (Frankel & Soule, 1981) due to genetic effects of inbreeding (Hartl & Clark, 1989). The inferred  $N_e$  is large enough to guarantee the future of this population if we consider that the values suggested to avoid negative impacts from genetic drift and inbreeding are, respectively, two and one orders of magnitude smaller (Franklin, 1980) than those we report here for the Michoacán population.

---

*Conservation Implications*

The absence of detectable genetic structure in the Michoacán EPGT should not preclude continuation of conservation efforts encompassing all rookeries in this area, and those further south in the country. Our genetic results would indeed suggest significant inter-rookery genetic exchange over evolutionary timescales ( $N_m > 38$  from the microsatellite data and  $>3.5$  from mtDNA data), that would provide the potential for restocking and sustaining individual rookeries in the region. However past experience of extirpation of many historic EPGT rookeries along the Pacific coast of México (e.g. those in Jalisco and Oaxaca States, where green turtles were known to have been abundant in the past) suggests that the speed with which human interference and human-induced environmental change manifest themselves can be overriding.

Ongoing genetic studies (Dutton et al. in preparation) on a broader geographic scale provide further insight into patterns and magnitude of inter- regional genetic exchange. An expanded, region-wide tagging program to complement and augment genetic results, in order to better understand long-term abundance trends, as well as the extent of short-term inter-rookery movements. This information will be needed to guide robust management strategies that may guarantee the long-term survival of the EPGT.

---

## Acknowledgements

We thank G. Hernandez and A. Samaniego for valuable assistance in sample collection, Suzanne Roden, Robin Leroux, Erin LaCasella (NOAA-NMFS Southwest Fisheries Science Center) and Nidia Perez (CIECO-UNAM) for laboratory assistance, Daniel Piñero (IE-UNAM) for laboratory support and Luis Eguiarte (IE-UNAM) and Nancy FitzSimmons (Univ. Canberra) for comments to the manuscript. All work was conducted in accordance with international (CITES, 2000) and Mexican legislation (PROY-NOM-059-ECOL-2000) under the following scientific collection permits: DOO 550.-4628/96 (September 26, 1996) and DOO 750.-7562/97 (September 3, 1997) (Direccion General de Vida Silvestre, Instituto Nacional de Ecologia, SEMARNAP), CITES Permits MX 06107 and 01US844694/9. This study was funded in part by the MEXUS program and the NOAA-National Marine Fisheries Service. This study is part of Omar Chassin-Noria's Ph.D. dissertation also supported by a scholarship from CONACYT (No. 94104).

---

## References

- Allard, W.M., M.M. Miyamoto., A.K. Bjorndal., B.A. Bolten & B.W. Bowen, 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1: 34-41.
- Abreu-Grobois, F.A., A.L. Bass., R. Briseño-Dueñas., P.H. Dutton., S.E. Encalada & N.N. FitzSimmons, 1996. Mitochondrial DNA d-loop sequences of marine turtles, pp. 147-162 in *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*, edited by B.W. Bowen & W.N. Witzell. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-396.
- Arenas, P., L. Sarti, & P. Ulloa, 2000. Conservation and management of sea turtles in México. pp. 6-7 in *Proceedings of the Eighteenth International Sea Turtle Symposium*, compiled by Abreu-Grobois, F.A., R. Briseño-Dueñas., R. Marquez, R. & L. Sarti. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-436.
- Awise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Bass, A.L., D. A. Good, K. A. Bjorndal, J. I. Richardson, Z. M. Hillis, J. A. Horrocks & B. W. Bowen, 1996. Testing models of female reproductive migratory behaviour and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 5: 321-328.
- Bocourt, M. 1868. Description de quelques cheloniens nouveaux appartenant a la faune Mexicaine. *Ann. Sci. Natur. Ser. 5 Zool.* 10: 121-122.



- Bowen, B.W., A.B. Meylan & J.C. Avise, 1991. Evolutionary distinctiveness of the endangered Kemp's ridley sea turtle. *Nature* 352: 709-711.
- Bowen, B.W., A.B. Meylan, J.P. Ross, C.J. Limpus, G.H. Balazs & C.J. Avise, 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46: 865-881.
- Bowen, B.W., S.W. Nelson & C.J. Avise, 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment and conservation relevance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5574-5577.
- Bowen, B.W., N. Kamezaki, C.J. Limpus, G.R. Hughes, A.B. Meylan & J.C. Avise, 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution* 48:1820-1828.
- Bowen, B.W., F.A. Abreu-Grobois, G.H. Balazs, N. Kamezaki, C.J. Limpus & R.J. Ferl, 1995. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3731-3734.
- Bowen, B.W., A.M. Clark, F.A. Abreu-Grobois, A. Chaves, H.A. Reichart & R.J. Ferl, 1998. Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys spp.*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 101: 179-189.
- Caetano-Anolles, G. & P.M. Gresshoff, 1994. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes Magazine* 45: 13-21.
- Cann, L.R. M. Stoneking, C.A. Wilson, 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.

- 
- Chassin-Noria, O. 2002. Estructura genetica y sistematica molecular de la tortuga negra *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758) del estado de Michoacán México. Ms C Thesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autonoma de México.
- CITES The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. As adopted by the Conference of the Parties, valid from 19 July 2000.
- Cliffton, K., D. Cornejo & S. Felger, 1982. Sea turtles of the pacific coast in México pp. 199-209 in Biology and conservation of sea turtle, edited by K. Bjorndal. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Coates, A.G., J.B.C. Jackson, L.S. Collins, T.M. Cronin, H.J. Dowsett, L.M. Bybell, P. Jung & J.A. Obando, 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. Bull. Geol. Soc. Am. 104: 814-828.
- Crim, J.L., L.D. Spotila, J.R Spotila, M. O'Connor, R. Reina, C.J. Williams & F.V. Paladino, 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. Mol. Ecol. 11: 2097–2106.
- Crow J.F. & M. Kimura, 1970. An introduction to population genetic theory. Harper & Row, New York.
- Cummings, M.P. & M.T. Clegg, 1998. Nucleotide sequence diversity at the alcohol dehydrogenase 1 locus in wild barley (*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*): an evaluation of the background selection hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5637-5642.
- Delgado, C. & J. Alvarado, 2001. Recovery of the black sea turtle (*Chelonia agassizii*) in Michoacán, México: an integrated conservation approach. Final report 2000-2001. U.S. Fish and Wildlife Service.

- 
- Dutton, P.H., 1996a. Use of molecular markers for stock identification, fingerprinting, and the study of mating behavior in leatherbacks, pp. 79-86 in Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics, edited by Bowen, B.W. & W.N. Witzel. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396.
- Dutton, P.H., 1996b. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies, pp. 17-24 in Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics, edited by Bowen, B.W. & W.N. Witzel. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396.
- Dutton, P.H., S.K. Davis, T. Guerra & D. Owens, 1996. Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 511-521.
- Dutton, P.H., B.W. Bowen, D.W. Owens, A. Barragan, & S.K Davis, 1999. Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Zool.* 248: 397-409.
- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, K.A Bjordnal., A.B Bolten., M.M Miyamoto & B.W. Bowen, 1996. Phylogeography and population structure of Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol. Ecol.* 5: 473-484.
- FitzSimmons, N.N., 1997. Male marine turtles: gene flow, philopatry and mating systems of the green turtle *Chelonia mydas* Ph D thesis, University of Queensland Australia.

- 
- FitzSimmons, N.N. C. Moritz, C.J. Limpus, L. Pope & R. Prince, 1997. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and Male-Biased Gene Flow. *Genetics* 147: 1843-1854.
- FitzSimmons, N.N., 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Mol. Ecol.* 7: 575-584.
- Frankham, R., 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* 10: 1500-1508.
- Frankel, O.H. & M.E. Soule, 1981. Conservation and evolution. Cambridge University Press. Cambridge & New York.
- Franklin, I.R., 1980. Evolutionary change in small populations. pp. 135-149 in Conservation biology an evolutionary-ecological perspective, edited by M.E. Soule, and B.A. Wilcox. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Gardner, S.C. & W.J. Nichols, 2001. Assessment of sea turtle mortality rates in the Bahia Magdalena region, Baja California Sur, México. *Chelonian Conserv. Biol.* 4: 197-199.
- Glenn, T., W. Stephan & J. Braun, 1999. Effects of a population bottleneck on whooping crane mitochondrial DNA variation. *Conserv. Biol.* 13: 1097-1107.
- Goodman, S.J., 1997. RST CALC: A collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Mol. Ecol.* 6: 881-885.
- Grant, W.S. & B.W. Bowen, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fisheries: Insights from Sardines and Anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89: 415-426.

- 
- Hartl, D.L. & A.G. Clark, 1989. Principles of population genetics. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Higgins, D.G., A.J. Bleasby & R. Fuchs, 1991. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Cabios* 8: 189-191.
- Hirth, F.H., 1997. Synopsis of the Biological Data on The Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). Biological Report, 97(1) FWS-US.
- Hurtado, M., 1984. Registros de anidacion de la tortuga negra, *Chelonia mydas*, en las Islas Galapagos. *Boletin Cientifico y Tecnico* 4: 77-106.
- Kaessmann, H., V. Wiebe & S. Pääbo, 1999. Extensive nuclear DNA sequence diversity among chimpanzees. *Science* 286: 1159-1162.
- Kamezaki, N. & M. Matsui, 1995. Geographic variation in the skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*, with a taxonomic discussion. *J. Herpetol.* 29: 1-60.
- Karam, S., 1997. Patrones de sustitucion nucleotidica de la region de control del DNA mitocondrial de tortugas marinas. B. Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autonoma de México.
- Karl, S.A., B.W. Bowen & J.C. Avise, 1992. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131: 163-173.
- Karl, S.A. & B.W. Bowen, 1999. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conserv. Biol.* 13: 990-999.
- Kumazawa, Y. & M. Nishida, 1995. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Mol. Biol. Evol.* 12: 759-772.

- 
- Lacy, R.C., 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conserv. Biol.* 1: 143–158.
- Lahanas, P. N., M.M. Miyamoto., K.A. Bjorndal & A.B. Bolten, 1994. Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica* 94: 57-67.
- Limpus, C. J., J.D. Miller, & C.J. Parmenter, 1993. The Northern Great Barrier Reef green turtle, *Chelonia mydas*, breeding population, pp. 47-50 in *Raine Island and Environs, Great Barrier Reef: Quest to preserve a fragile outpost of nature*, edited by A.K. Smyth, K.H. Zevering, and C.E. Zevering. Raine Island Corporation in cooperation with Great Barrier Reef Marine Park Authority.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch & J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, New York.
- Marquez, R.J., 1990. *Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date*. FAO Fisheries Synopsis. No. 125 Vol. 11, Rome, FAO.
- McElroy, D., P. Moran, E. Bermingham & I. Kornfield, 1992. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J Hered.* 83: 157-158.
- Meylan, A.B., B.W. Bowen & J.C. Avise, 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* 248: 724-727.
- Mills, L.S. & P.E. Smouse, 1994. Demographic consequences of inbreeding in small remnant populations. *Am. Nat.* 144: 412-431.

- 
- Mills, L.S. & F.W. Allendorf, 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conserv. Biol.* 10:1509-1518.
- Moritz, C., T.E. Dowling & W.M. Brown, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Norman, J.A., C. Moritz., C.J. Limpus, 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Mol. Ecol.* 3: 363-373.
- Owens, W.D. & G.J. Ruiz, 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 36: 17-20.
- Pianka, E.R., 2000. *Evolutionary ecology*. Benjamin/Cummins, San Francisco.
- Pritchard, P.C., 1999. Status of the black turtle. *Conserv. Biol.* 13: 1000-1003.
- Prichard, P.C. & J. Mortimer, 1999. Taxonomy, external morphology, and species identification, pp. 21-40 in *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*, edited by Eckert K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois & M. Donnelly. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.
- Raymond, M. & F. Russet, 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 80: 248-249.
- Rice, W.M., 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution* 43: 223-225.
- Saiki, R.K., D. H. Gelfand, S.J. Stoffel, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, & H. A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

- 
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier, 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Soule, M.E. & K.A. Kohm, 1989. Research priorities in conservation biology. Island Press. Washington, D. C.
- Tajima, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. 123: 597-601.
- Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition transition-transversion and G+C content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687.
- Taylor, B. & A.E. Dizon, 1996. The need to estimate power to link genetics and demography for conservation. *Conserv. Biol.* 10: 661-664.
- Watterson, G., 1975. On the number of segregating sites in the genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* 7: 256-276.
- Whitehouse, A.M. & E.H. Harley, 2001. Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 10: 2139-2149.
- Zarate, P., A. Fernie & P.H. Dutton, 2003. First results of the east Pacific green turtle, *Chelonia mydas*, nesting population assessment in the Galapagos Islands. in *Proceedings of the 22nd Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Tech Memo. In Press.
- Zug, G.R., G.H. Balazs, J.A. Wetherall, D.M. Parker & S.K.K. Murakawa, 2002. Age and growth of Hawaiian green seaturtles (*Chelonia mydas*): an analysis based on skeletochronology. *Fish. Bull.* 100: 117-127.



---

Figure legends

*Figure 1.* Location of EPGT rookeries sampled in Michoacán State (México). COL remains the single most abundant continental EPGT rookery in the east Pacific.

*Figure 2.* Network describing evolutionary relationships among the Michoacán EPGT mtDNA control region haplotypes in Table 1. An asterisk indicates the single parsimony-informative site; the circles' sizes are proportional to haplotype frequencies in the whole of Michoacán. The numbers represent the polymorphic positions in our 400 pb haplotypes, where position 1 corresponds to position 15630 of the *C. mydas* mitochondrial genome in GenBank AB012104

*Figure 3.* Allele frequency distribution for three microsatellite loci (Cm3, Cm72, and Cc7) in Michoacán EPGT rookeries. Allele frequencies were grouped for all rookeries as no statistically significant heterogeneity was detected (see text).

Figure 1

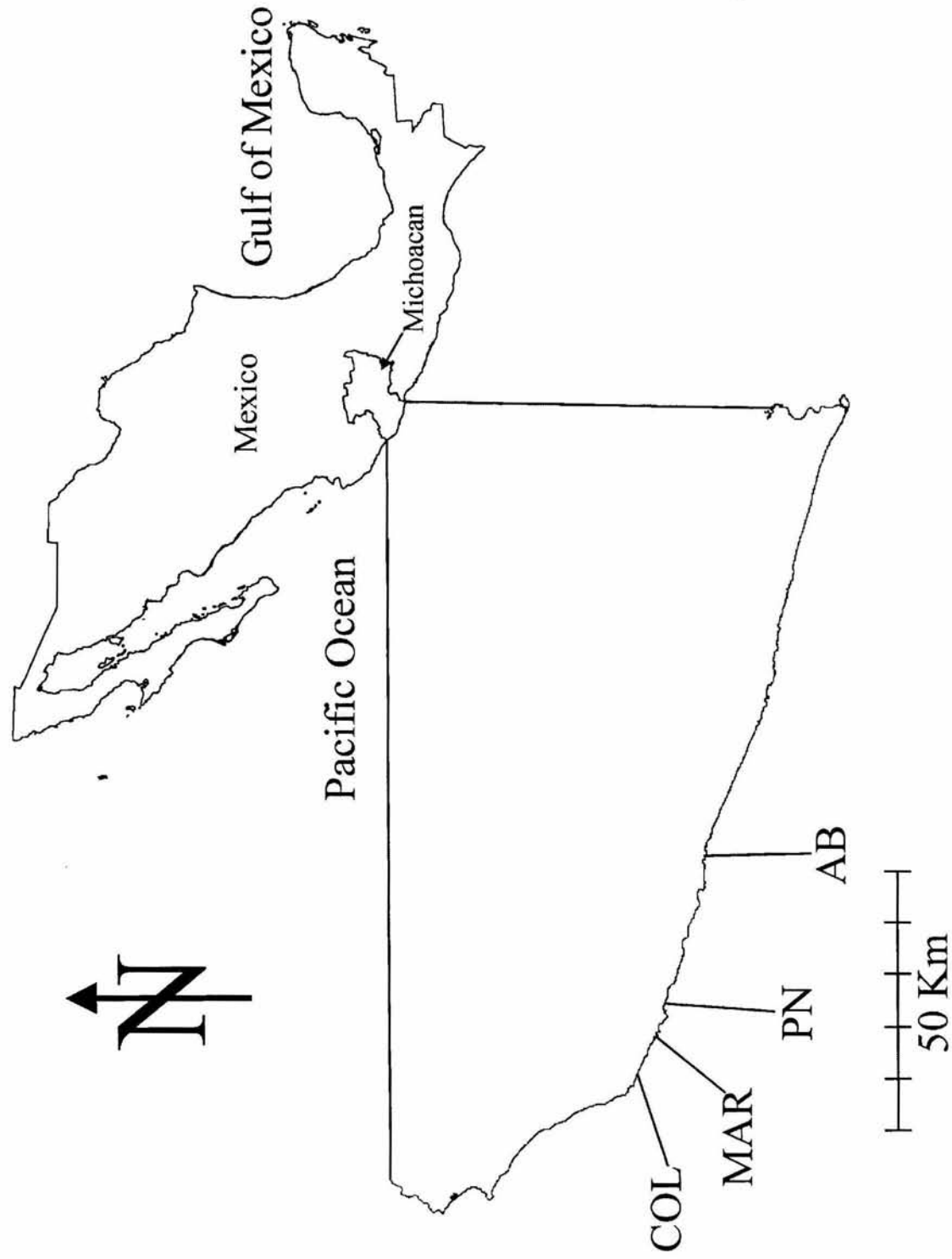
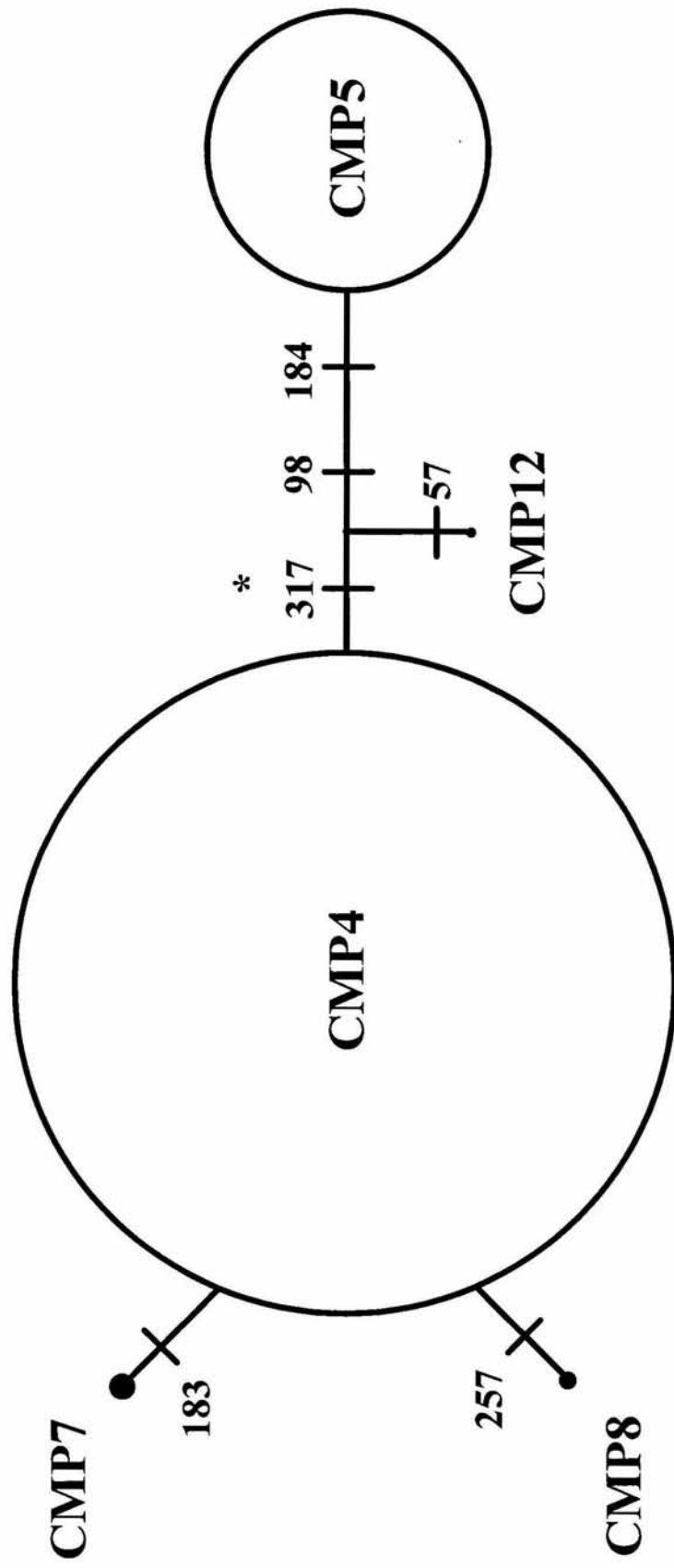
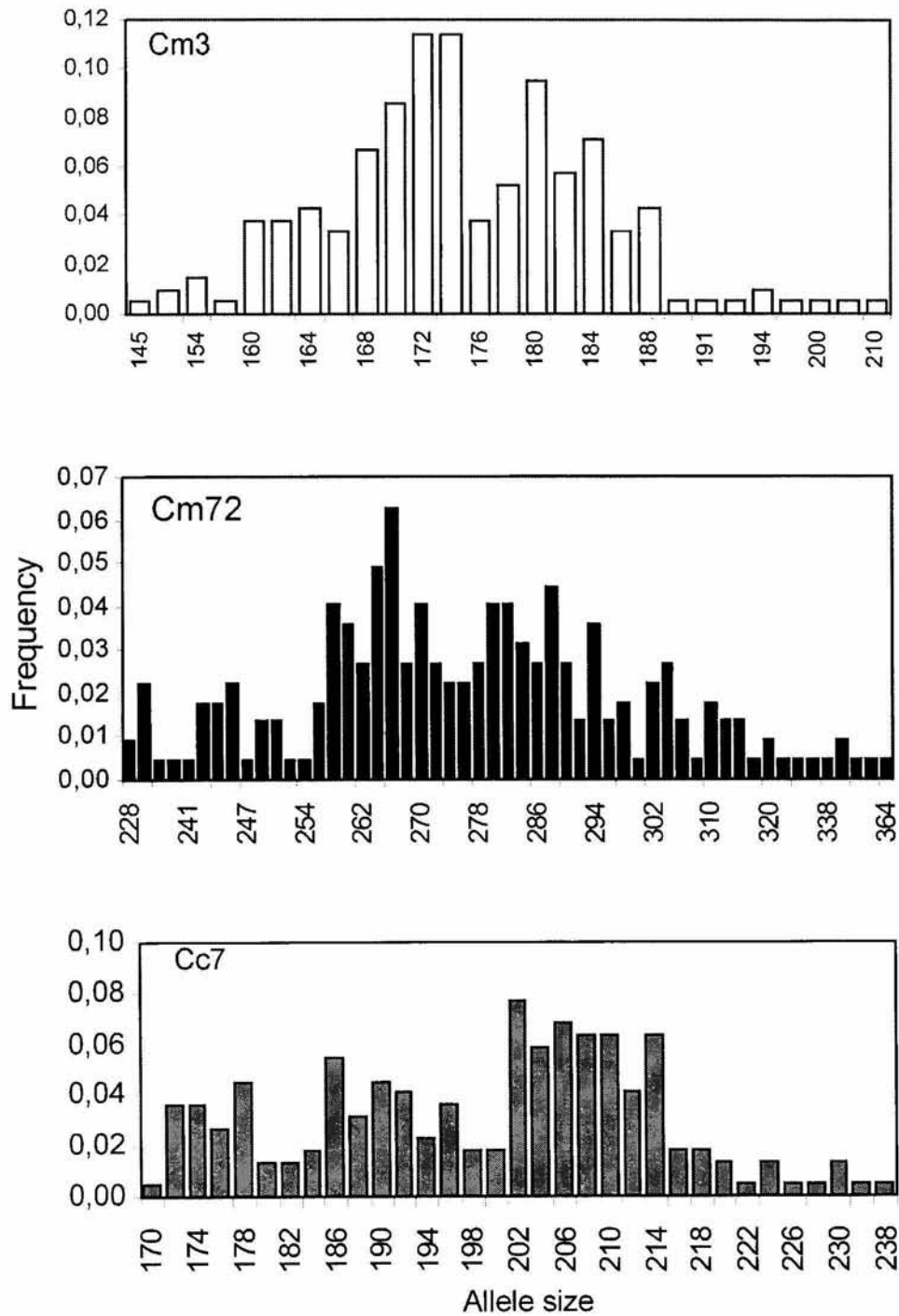


Figure 2



**Figure 3**



*Table 1.* mtDNA control region haplotype frequencies at four Michoacán EPGT rookeries. (GenBank accession numbers AY382323-AY382327, with position 1 corresponding to position 15630 of *C. mydas* complete mtDNA sequence of GenBank accession number 15630).

Rookery	N	haplotype frequency				
		CMP4	CMP5	CMP7	CMP8	CMP12
Colola	70	0.69	0.29		0.03	
Maruata	19	0.53	0.42	0.05		
Paso de Noria	15	0.87	0.13			
Arenas Blancas	19	0.58	0.26			0.16
Overall	123	0.67	0.28	0.01	0.02	0.02

Table 2. mtDNA control region sequence diversity in Michoacán EPGT, as measured by  $h$  (haplotype diversity) and  $\pi$  (nucleotide diversity).  $N$  denotes sample size, values in parenthesis are standard errors. As no significant genetic differentiation was detected between seasons for any of the rookeries (results not shown), data for the two sampled seasons were grouped for each rookery. Values for other species are included for comparison.

Rookery	N	Haplotype diversity, $h$	Nucleotide diversity, $\pi$	Ref.
Michoacán (grouped results)	123	0.48 (0.04)	0.0036 (0.0024)	This work
Colola	70	0.45 (0.05)	0.0033 (0.0023)	This work
Maruata	19	0.57 (0.06)	0.0041 (0.0028)	This work
Paso de Noria	15	0.25 (0.13)	0.0018 (0.0016)	This work
Arenas Blancas	19	0.60 (0.09)	0.0052 (0.0034)	This work
Other species:				
<i>Chelonia mydas</i> (Atlantic)	8-15	0.200-0.618	0.004-0.0053	Lahanas et al. (1994)
<i>Caretta caretta</i> (Atlantic and Mediterranean)	11-105	0.00-0.67	0.000-0.0294	Encalada et al. (1998)
<i>Eretmochelys imbricata</i> (Atlantic)	14-15	0.125-0.782	0.0012-0.0060	Bass et al. (1996)
<i>Lepidochelys olivacea</i> (global)	80	0.00-0.81	0.000-0.0207	Bowen et al. (1998)
<i>L. kempii</i>	9	0.69	0.0033	Bowen et al. (1998)

*Table 3.* Summary of genetic variation at 3 microsatellite loci for EPGT rookeries in Michoacán (see text for site codes).

Locus		Rookery				Mean N <sub>A</sub> /locus
		COL	MAR	PN	AB	
Cm3	N	62	14	10	17	15.3
	N <sub>A</sub>	23	13	11	14	
	H <sub>exp</sub>	0.98	1.00	0.80	0.88	
	H <sub>obs</sub>	0.94	0.94	0.97	0.94	
	P	0.16	0.83	0.13	0.12	
Cm72	N	64	15	15	19	27.8
	N <sub>A</sub>	46	19	19	25	
	H <sub>exp</sub>	0.84	0.80	1.00	1.00	
	H <sub>obs</sub>	0.98	0.97	0.96	0.97	
	P	0.00	0.07	0.53	1.00	
Cc7	N	62	16	15	18	19.8
	N <sub>A</sub>	33	16	13	17	
	H <sub>exp</sub>	0.90	1.00	0.80	0.72	
	H <sub>obs</sub>	0.96	0.95	0.95	0.95	
	P	0.04	0.81	0.19	0.02	
Mean N <sub>A</sub> /location		34.0	16.0	14.3	18.7	20.8
Mean H <sub>exp</sub>		0.91	0.93	0.87	0.87	
Mean H <sub>obs</sub>		0.96	0.95	0.96	0.96	
Multilocus F <sub>IS</sub>		0.06	0.06	0.07	0.09	

N = number of individuals sampled, N<sub>A</sub> = number of alleles, H<sub>exp</sub> = unbiased expected heterozygosity (Nei, 1978), H<sub>obs</sub> = observed heterozygosity, and P = probability for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. No significant deviations from H-W equilibrium were found after sequential Bonferroni correction (Rice, 1989).

*Table 4.* Measures of genetic subdivision among EPGT rookeries in Michoacán. (A) Pair-wise  $F_{st}$  estimates from mtDNA control region sequence data. (B) Microsatellite pair-wise testing for all loci  $R_{st}$  values, above the diagonal, and  $F_{st}$  values, below the diagonal. None of the comparisons exhibited significant deviations from 0 at  $\alpha = 0.05$  in permutation testing.

(A)

	Colola	Maruata	Paso de Noria
Maruata	0.004		
Paso de Noria	0.024	0.123	
Arenas Blancas	0.020	0.029	0.023

(B)

	Colola	Maruata	Paso de Noria	Arenas Blancas
Colola		0.024	0.004	0.002
Maruata	0.006		-0.036	0.026
Paso de Noria	0.005	0.002		0.002
Arenas Blancas	0.002	0.001	0.002	



---

## CAPÍTULO III

### Sistema de apareamiento de la tortuga verde del Pacífico oriental

#### Introducción

La información sobre la biología de las tortugas marinas se ha obtenido en su mayoría de los periodos en los que las hembras permanecen en tierra, ya sea durante el periodo de anidación, incubación, proceso de eclosión, emergencia y desplazamiento al mar. Más recientemente, gracias al empleo de herramientas moleculares se ha logrado dilucidar aspectos de la biología de las tortugas marinas, permitiendo acceder a una información antes inasequible, incluyendo aspectos sobre la biología particular de los machos e incrementando el conocimiento de procesos biológicos que se realizan en el mar, como la cópula.

En el caso de tortugas marinas del género *Chelonia* la cópula se desarrolla frente a las playas de anidación, donde se reporta un comportamiento poligámico (Booth y Peters 1972; Alvarado y Figueroa 1991; Martínez 2003). Sin embargo, existe incertidumbre con respecto a si este patrón de conducta se ve reflejado en la composición de la progenie generada.

Definir el sistema de apareamiento de las tortugas marinas es un elemento que permite enriquecer el conocimiento sobre su biología, tiene implicaciones a nivel poblacional, debido a que del número de progenitores involucrados en la fecundación de un nido, depende la diversidad genética de la progenie (Jennions y Petrie 2000) y por extensión la de la población.

---

*Sistemas de apareamiento*

El estudio de los sistemas de apareamiento hasta hace un par de décadas tenía como base metodológica, para obtención de información, la observación directa o indirecta de la actividad reproductiva de los organismos vivos. Con esta información se definieron los dos sistemas básicos de apareamiento (Partridge y Halliday 1984).

- a) Monogamia: Un individuo macho o hembra se aparea con un solo individuo durante la temporada de reproducción.
- b) Poligamia: dos clases.
  - Poliginia: Un macho se aparea con más de una hembra en la temporada de reproducción.
  - Poliandria: Una hembra se aparea con más de un macho en la temporada de reproducción.

A partir de estos sistemas establecidos, fue posible sugerir las explicaciones evolutivas en términos de la disponibilidad de recursos asociada a cada uno de estos escenarios. Los sistemas poligámicos están asociados a organismos que no son capaces de monopolizar recursos y los sistemas monogámicos se presentan comúnmente en organismos que son capaces de monopolizar recursos.

*Herramientas moleculares y sistemas de apareamiento*

Cuando las técnicas moleculares empezaron a usarse para confrontar la información empírica de conducta, contra las predicciones genéticas esperadas en

---

los distintos sistemas de apareamiento, se generó evidencia, que contradecía las predicciones. Por ejemplo en el caso de las aves antes de 1970 se sugería que 93 % de las subfamilias de paseriformes eran normalmente monógamas (Lack 1968 en Griffith *et al.* 2002), y al paso de tres décadas la evidencia molecular ha cambiado dramáticamente este enunciado. En una revisión de 150 trabajos que evalúan la frecuencia de paternidad múltiple en aves, se encontró que en casi el 90 % de las especies presentan paternidad múltiple (Griffith *et al.* 2002).

Es a la luz de la evidencia molecular que se ha logrado detectar el verdadero sistema de apareamiento de muchas aves. Por ejemplo en *Passerina cynea*, un paseriforme, muestra un comportamiento prácticamente monógamo en el que solo el 3.3 % de las cópulas son extra-pareja. Sin embargo, cuando se realizaron estudios moleculares de paternidad con esta especie, se encontró que del 27 al 42% de las fertilizaciones eran resultado de cópulas extra pareja (CEP) (Westneat 1987).

En Cormoranes del género *Phalacrocorax* se cuantificaron las CEP y se demostró que su frecuencia es proporcional a las Fertilizaciones Extra Pareja (FEP) (Graves *et al.* 1991). En *Phylloscopus trochilus* las CEP tienen un 13% de frecuencia y el resultado de FEP es de cero (Gyllensten *et al.* 1990).

A partir de esta nueva información se establece la necesidad de definir el sistema de apareamiento etológico (SAE) como el que se define con base a las asociaciones observables entre individuos en cópula y el sistema de apareamiento genético (SAG) definido como la descripción de las asociaciones establecidas entre genotipos involucrados en la generación de progenie (Hughes 1998).

---

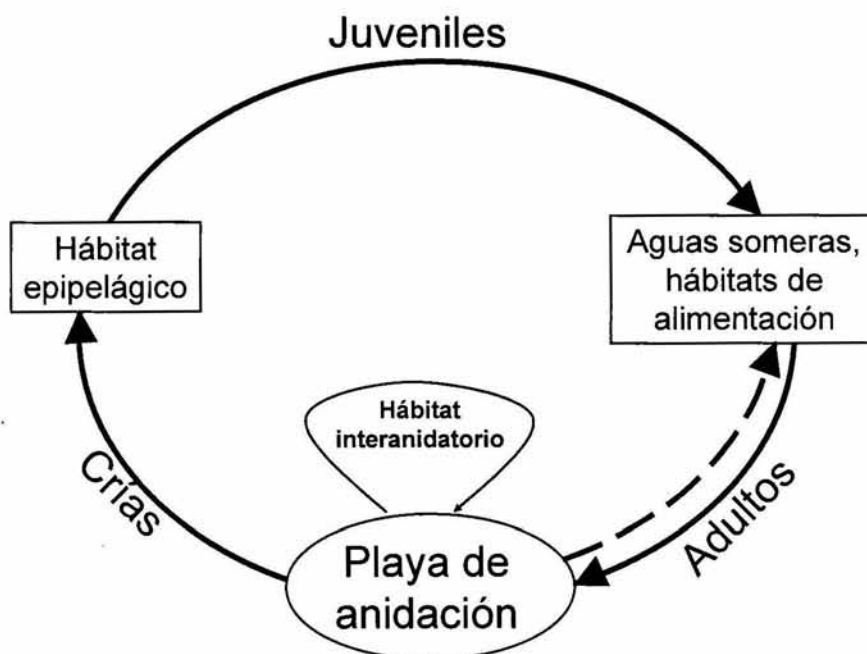
La información obtenida con técnicas moleculares no solo ha presentado más resolución para describir consistentemente los sistemas de apareamiento. Esta tecnología ha abierto la posibilidad de escrutinio de nuevas interrogantes. Por ejemplo, hay que explicar el impacto sobre la adecuación de las CEP que en algunos casos es alto y en otros es aparentemente de cero. En este último escenario, ¿Por qué hay CEP si no aumentan la adecuación del ejecutante?, ¿Por qué existen hembras que acceden a copular con más de un macho por temporada reproductiva y sin embargo privilegian a uno solo para fecundar sus gametos? ¿Qué procesos están asociados a la elección del macho que fertiliza los gametos de una hembra?

Con la automatización de las metodologías moleculares para escrutinio de frecuencia de paternidad múltiple en vertebrados, se ha logrado que esta información sea cada vez más asequible, permitiendo el esclarecimiento de los sistemas de apareamiento y factores involucrados en la determinación de los mismos.

#### *Ciclo de vida de las tortugas marinas*

Las tortugas marinas son organismos que dependen del medio acuático y terrestre para completar su ciclo de vida (Figura 2.1). Las tortugas del género *Chelonia* realizan movimientos migratorios entre la playa de anidación y las áreas de alimentación en donde se presume permanecen hasta que alcanzan la madurez sexual, proceso que demora entre 12-26 años (Frazer y Ladner 1986) y que se conoce como el "año perdido", debido a la carencia de información sobre la biología de las tortugas en este periodo. Ya alcanzada la madurez sexual las

TVPO tienen un periodo remigratorio de 3 años en promedio (Alvarado y Figueroa 1990). Las TVPO que tienen actividades de anidación en la costa Michoacana se desplazan hacia áreas de alimentación reportando recapturas de individuos frente a Costa Rica y en el golfo de California (Alvarado y Figueroa 1992; Seminoff *et al.* 2002).



**Figura 2.1.** Ciclo de vida de las tortugas marinas del género *Chelonia*. (Modificado de Hirt 1997).

Para ambos sexos de tortugas marinas, se sugiere un comportamiento filopátrico que ha sido evidenciado por los programas de marcaje (Miller 1996) y más recientemente por la aplicación de herramientas moleculares (Meylan *et al.* 1990; Bowen *et al.* 1995; FitzSimmons 1997).

---

*Sistema de apareamiento en tortugas marinas*

El SAE observado en tortugas del género *Chelonia* es básicamente poliándrico, esta conducta puede explicarse debido a características biológicas propias de las tortugas:

- Aparentemente no hay recursos (alimento, sitios de anidación, refugios) que sean susceptibles de monopolizar, por lo tanto los machos no protegen un territorio que sea atractivo para las hembras que les permita acceder a un mayor número de hembras para cópula.
- Los machos no ofrecen a las hembras nada más que la cópula, no hay cuidado parental y no se otorga regalo nupcial (o al menos éste no es visible).

Esto genera que la cópula se dé en función de la disponibilidad de machos para las hembras y de la receptividad y proceso de elección de las hembras para los machos.

Para el género *Chelonia* es posible observar la cópula debido a que se desarrolla frente a las playas de anidación, facilitando la elaboración de estudios de conducta reproductiva en los que se ha reportado un SAE poliándrico (Alvarado y Figueroa 1991; Martínez 2003).

Frente a los sitios de anidación de la TVPO en el estado de Michoacán puede observarse durante la temporada de anidación (de septiembre a enero de cada año) a las hembras flotando en la superficie por largos periodos en los que se agregan varios machos adultos. Se han observado hasta diez machos cortejando a una hembra (Martínez 2003), hasta que un macho logra la cópula.

---

Los machos que no acceden a la cópula se mantienen cercanos a la “mancuerna” (pareja de tortugas copulando), buscando activamente el desplazamiento del macho copulante para acceder a la hembra. Este periodo puede prolongarse por periodos de más de 50 minutos con una relación inversa entre el número de machos involucrados en el cortejo y la duración de la cópula (Martínez, 2003).

El sesgo observado en la proporción hembra: macho puede explicarse de dos maneras: (a) Es posible que los machos formen estructuras “lek”. En los leks puede observarse algún nivel de cooperación entre sus integrantes para acceder a la cópula. Se ha observado que los individuos formadores del lek pueden estar emparentados con lo que se incrementa su adecuación inclusiva (Queller 1996; McDonald y Potts 1994). (b) Es posible que la proporción sexual sesgada a machos se deba al uso de áreas conspicuas del paisaje marino y terrestre (landmarks) en las que los machos se reúnen para facilitar su encuentro con hembras receptivas sin establecer una relación de cooperación para acceder a la cópula.

Cuando las hembras adultas de la TVPO michoacanas migran de las áreas de alimentación a las áreas de cópula-anidación se mantienen en el área circundante por un periodo suficiente para producir en promedio 2.6 nidos (intervalo de uno a nueve) de 65.1 huevos en promedio (intervalo de 1 a 130) espaciados temporalmente por un periodo interanidatorio de entre 12 y 14 días (Alvarado y Figueroa 1990) en el que se puede observar a las hembras copulando.

---

*Herramientas moleculares y sistemas de apareamiento en tortugas marinas*

En los últimos 10 años se ha incrementado el conocimiento sobre la frecuencia de paternidad múltiple de las tortugas marinas, gracias al uso de marcadores moleculares. A la fecha se han realizado estudios con cinco especies de tortugas marinas (Moore y Ball 1999).

Peare (1994) considera que la paternidad múltiple puede variar entre especies y entre poblaciones de una misma especie de tortuga; en Tortuguero, Costa Rica este autor encontró que algunas nidos de *Ch. mydas* fueron fertilizados hasta por cuatro machos mientras que FitzSimmons (1996) encontró que en Australia la paternidad múltiple en la misma especie es baja o ausente. Harry (1988) reporta que en el 30% de los nidos de *Caretta caretta* de la costa de Australia se presenta paternidad múltiple. En poblaciones de tortuga laúd *Dermochelys coriacea* de Costa Rica menos del 10% de los nidos presentan paternidad múltiple (Curtis *com. pers.*), en la tortuga lora, *Lepidochelys kempii*, la paternidad múltiple se presenta en más del 50% de los nidos (Kichler *et al.* 1999). Sugiriendo que en algunos casos, los múltiples machos que participan en las cópulas si fertilizan los huevos y en otros no.

La existencia o ausencia de la paternidad múltiple tiene implicaciones importantes para la conservación de las tortugas ya que podría afectar los niveles de variabilidad genética de cada nidada, entre mayor sea la frecuencia de paternidad múltiple, mayor será la diversidad genética de la progenie. Y la diversidad genética podría afectar la capacidad de adaptación de la población (Soulé 1980).



---

*Microsatélites*

El termino microsatélites es empleado para designar pequeñas secuencias en el ADN (no más de seis nucleótidos, frecuentemente dos) repetidas en tandem, que pueden ser muy polimórficas en cuando al número de repetidos, particularmente en repetidos ininterrumpidos. No se conoce una función particular para los microsatélites pero la frecuencia de microsatélites en el genoma de vertebrados es mayor a la esperada por azar (Valle 1993) además de que se les encuentra distribuidos uniformemente en el genoma de los eucariontes (Hancock 1999). En general se acepta que los microsatélites son de los elementos más polimórficos del genoma de los eucariontes con tasas de mutación tan altas como  $10^{-3}$  por locus por generación.

La alta tasa de mutación se ha explicado es consecuencia de dos procesos no mutuamente excluyentes. (a) Un resbalón y mal apareamiento de la doble hélice en el momento de la replicación (slippage-mispairing) (Levinson y Gutman 1987) (b) La recombinación por entrecruzamiento no complementario (unequal crossing-over) o conversión génica (Armour *et. al.* 1999).

Los microsatélites son usados como un marcadores por varias razones. Diferentes loci de microsatélites pueden ser usados de acuerdo a su variabilidad que va de niveles detectados con análisis de isoenzimas hasta una variación tan alta como la detectada con minisatélites (Beaumont y Bruford 1999). Los microsatélites tienen un patrón de herencia codominante (Hancock 1999). Una vez obtenidos los oligonucleótidos para una especie es posible usarlos en especies cercanas (Jones y Avise 1997). Pueden ser más consistentemente

---

utilizados con respecto a los minisatélites para detectar paternidad múltiple e identificar con certidumbre a los progenitores (Primmer *et al.* 1995).

En trabajos de genética de poblaciones, los microsatélites han permitido estimaciones de parámetros poblacionales como tamaño efectivo ( $N_e$ ), flujo génico ( $N_m$ ) y tiempo a la coalescencia de los alelos (Luikart y England 1999).

Los microsatélites además pueden ser empleados para complementar estudios mitocondriales permitiendo definir Unidades de Manejo y Unidades Evolutivas Significativas en el sentido propuesto por Moritz (1994). Estas características aunadas a la automatización en los métodos asociados a microsatélites permite actualmente el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo.

Sin embargo, también se han observado algunos problemas asociados a microsatélites. La obtención de los oligonucleótidos para detectar microsatélites polimórficos es un proceso complicado, que en ocasiones puede no generar resultados después de la inversión de un esfuerzo considerable (Beaumont y Bruford 1999).

Existen artificios metodológicos, que pueden dificultar el análisis de datos debido al uso de la PCR, particularmente los productos de tartamudeo de la polimerasa "stutter" que pueden confundirse con los alelos verdaderos. Se ha detectado la adición de una adenina en la cadena sintetizada generando artificios con un tamaño en pares de bases igual al tamaño del alelo mas uno, generando confusión para determinar qué productos son artificios y cuáles son del verdadero alelo. También se han observado alelos que no es posible amplificar por PCR

---

(alelos nulos), debido a mutaciones en los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos (Schlötterer 1998).

Los resultados obtenidos en un equipo (por ejemplo ABI PRISM® 3100) difícilmente son comparables con los obtenidos en otro equipo (por ejemplo ABI PRISM® 377), debido a diferencias en la asignación del tamaño de los alelos. Se ha observado una mayor diferencia en la asignación de tamaño de los alelos de un mismo locus e individuo, cuando se comparan datos obtenidos en electroforesis en poli-acrilamida y electroforesis en capilar (Beaumont y Bruford 1999; FitzSimmons *com pers.*; Dutton *com pers.*) por lo que se sugiere usar un solo equipo para el análisis de los datos de un trabajo.

Desde el punto de vista teórico, una complicación es que no se ha definido que modelo de mutación, el Stepwise Mutation Model (SMM) o Infinite Allele Model (IAM) es más eficiente para predecir el comportamiento de los alelos a nivel poblacional (Estoup y Cournet 1999). Sin embargo, con el incremento en el uso de estos marcadores seguramente se encontrarán soluciones a los inconvenientes detectados en este marcador.

#### *Análisis estadístico de los microsatélites en el estudio de sistemas de apareamiento*

Con el incremento de la información disponible de genotipos de individuos gracias a las mejoras en la obtención de genotipos con microsatélites, se ha dado un desarrollo notable también en las herramientas de análisis.

En el caso particular del análisis de paternidad, se han generado herramientas que permiten la optimización de recursos al establecer el tamaño de

---

muestra necesario para obtener resultados confiables (Dewoody *et al.* 2000), así como el grado de certidumbre para determinación de probabilidad de detección de paternidad múltiple y probabilidad de observación de genotipos idénticos en una población (Westneat *et al.* 1987; Hanotte *et al.* 1991). Además se han desarrollado una nueva generación de programas que permiten someter a prueba la hipótesis de presencia de paternidad múltiple con sistemas de apareamiento en plantas y animales basados en características de sistemas particulares (Kichler 1999; Dewoody *et al.* 2000; Wilson 2000; Ritland 2002). Esta información ha sido empleada con éxito también para en identificación forense y pruebas de parentesco con humanos (Huston 1998).

*Escenarios posibles de sistemas de apareamiento en la tortuga verde del Pacífico oriental*

Antes de la realización de este trabajo, se generaron cinco escenarios hipotéticos que se describen gráficamente en la Figura 2.2. Se considera que cada escenario es independiente. Los tres círculos de cada escenario corresponden a tres eventos de anidación en una temporada de anidación de una misma hembra y las letras en cada círculo representan el genotipo del, o de los machos que fertilizan los huevos de cada nido. Se presenta la contribución de solo dos machos y en una proporción de 50% de óvulos fertilizados cada uno, solo para hacer el grafico más sencillo.

Las evidencias con las que se generaron estos escenarios son las siguientes: a) Las hembras de TVPO tienen varios eventos de anidación en la

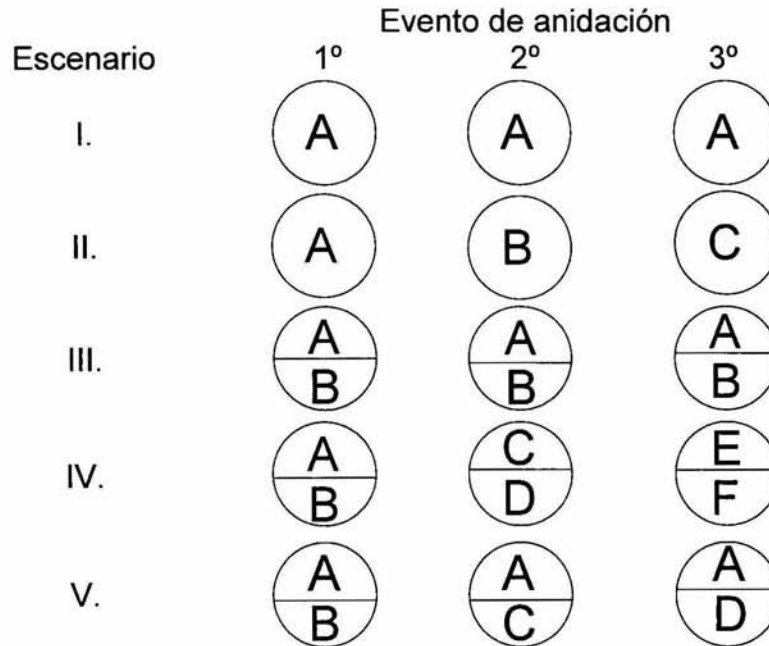
---

temporada, y durante estos eventos de anidación (periodo interanidatorio) se les observa copulando con múltiples machos. B) Las tortugas marinas tienen la capacidad de almacenar semen (Chaves *et al.* 2000; Miller 1997). c) La paternidad múltiple puede detectarse dentro de un mismo nido o entre distintos nidos de una hembra y cada macho tiene un genotipo particular y esta particularidad es detectable con la herramienta de análisis.

Escenarios:

- I. Una hembra fertiliza los huevos de toda una temporada con el semen de un solo macho (definido con el genotipo). Para esto se requiere que la hembra almacene semen de este macho. En este caso no hay paternidad múltiple. Si la hembra tiene la capacidad de almacenar el semen de un macho para fertilizar los huevos de toda una temporada. Será una interrogante la función de las cópulas en los periodos interanidatorios.
- II. Una hembra fertiliza los huevos de cada evento de anidación con el semen de un macho distinto. Esto implicaría que las cópulas de los periodos interanidatorios son importantes para fertilizar los óvulos de la hembra. En este escenario se plantea la existencia de paternidad múltiple entre los diferentes eventos de anidación, pero no dentro de un mismo nido.
- III. Una hembra fertiliza los huevos de toda la temporada de anidación, con el semen de dos o más machos (en la figura solo se representan dos, A y B) con los que cópula antes del primer evento de anidación, y almacena la mezcla de semen por toda la temporada. En este

escenario al igual que en el número I, la función de las cópulas interanidatorias será desconocida. Este escenario representa que hay paternidad múltiple dentro y entre los eventos de anidación pero los machos involucrados son los mismos toda la temporada.



**Figura 2.2.** Escenarios posibles del sistema de apareamiento de la tortuga negra (ver texto).

- IV. Una hembra fertiliza los huevos de cada evento de anidación con semen de dos o más machos, siendo diferentes los machos involucrados en cada nido. En este escenario se evidencia la importancia de las cópulas en el periodo interanidatorio, y la competencia entre los machos, por acceder a la cópula. Se presenta entonces paternidad múltiple dentro y entre los distintos eventos de anidación.

- 
- V. Una hembra fertiliza los huevos de cada evento de anidación con una mezcla de semen de dos o más machos. En este escenario algunos huevos de cada nido son fecundados por un macho que se encuentra representado en todos los eventos de anidación, por almacén de semen y el resto de los huevos de cada nido son fecundados por distintos machos que copulan en los periodos interanidatorios. Se presenta paternidad múltiple dentro y entre los distintos eventos de anidación.

En este trabajo se emplearon muestras de hembras anidadoras de TVPO de la playa de Colola, Michoacán, México y su progenie para determinar el número de machos que fecundan cada uno de los eventos de anidación, con la finalidad de establecer si existe congruencia entre el SAE y el SAG, empleando para este fin 4 loci de microsatélites. Finalmente se discuten algunos elementos para explicar las causas relacionadas con el sistema de apareamiento de las tortugas marinas.

## **Objetivo general**

Determinar los patrones de paternidad múltiple para la tortuga verde del Pacífico oriental del estado de Michoacán.

### *Objetivos particulares*

Identificar la resolución de cuatro loci de microsatélites para detectar paternidad múltiple.

Determinar con base en la distribución de frecuencias alélicas de una población el tamaño de muestra por nido, necesario para detectar paternidad múltiple.

Describir la variación en la frecuencia de paternidad múltiple en distintos eventos de anidación de una temporada para una misma hembra.

### *Hipótesis*

Al observarse una conducta poliándrica de las hembras de tortuga verde del Pacífico oriental en el estado de Michoacán, se espera detectar un sistema de apareamiento genético, poliándrico.



## **Materiales y Métodos**

### *Playa Colola*

La playa de Colola se encuentra ubicada a los 18°18'00" N y 103°26'45" W, en el municipio de Aquila del estado de Michoacán, México (ver capítulo II, pp 44). Colola es una playa de alta energía que corre de este a oeste con una longitud de 4.8km y con un ancho promedio de 150 m. En el extremo oeste de la playa se ubica el pueblo Colola y en el extremo oeste, la playa se encuentra interrumpida por una formación rocosa desde donde es posible observar a las tortugas copulando.

### *Material biológico*

El uso de la PCR en este trabajo permite que sea suficiente coleccionar pequeñas muestras de sangre y/o tejido sólido. Las muestras de sangre se obtuvieron, empleando el método reportado por Owens y Ruiz (1980). De los ejemplares adultos se coleccionaron entre 500 y 1000  $\mu$ l de sangre empleando una jeringa estéril de 5 ml con aguja de 18-22x 38 mm, la sangre fue suspendida en solución amortiguadora lítica (Apéndice I) en una proporción de 1:5-10 sangre: solución lítica, almacenándose en envases de plástico de 10 ml para su transporte al laboratorio. De las crías se obtuvieron de 5 a 20  $\mu$ l de sangre, usando jeringas de 1 ml con aguja de 27 x 13 mm. La sangre fue suspendida en solución amortiguadora lítica y almacenada en viales de plástico de 1.5 ml.

---

Cuando se encontraron ejemplares muertos, se colectaron fragmentos de tejido (piel o músculo) de ~0.5 g y se preservaron en una solución saturada sal-DMSO (Apéndice I) suficiente para cubrir toda la muestra.

Tanto la solución amortiguadora usada para sangre como para tejido permite el almacén de las muestras por un periodo de 6 meses a temperatura ambiente, sin que el DNA se degrade. En el laboratorio las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior.

Las fechas en las que se tiene reportada la mayor actividad de anidación es entre septiembre y enero presentándose el máximo de anidación entre octubre y noviembre de cada año (Alvarado y Figueroa 1990), por lo que la colecta de sangre de tortugas adultas se realizó en estos meses, y la colecta de sangre y tejido de crías desde la segunda quincena de noviembre a finales de enero.

La TVPO es una especie considerada en peligro de extinción en la norma oficial vigente (NOM-059-ECOL-2001) por lo que se obtuvieron los permisos de colecta e investigación científica DOO 750.-9400/98 y DOO 02.-4445 otorgados por la Dirección General de Vida Silvestre, INE-SEMARNAP, el 14 y 21 de septiembre de 1998 y 1999, respectivamente.

#### *Colecta de muestras*

Para determinar la frecuencia de paternidad múltiple, el escenario ideal es tener el genotipo de la madre, de la progenie y de los potenciales padres. Para esto se requiere la colecta de sangre o tejido. En el caso de la TVPO es sencillo obtener muestras de las hembras anidadoras, durante su estancia en la playa. En el caso de las crías, las muestras se obtuvieron de crías inmediatamente después

de su emergencia en vivero. Los machos de TVPO no salen a la playa por lo que solo es posible obtener muestras mediante la captura incidental por pescadores y en este caso no se tiene certidumbre de que al macho capturado haya participado activamente en la cópula con una hembra particular. Por esta razón, en este trabajo solo se obtuvieron muestras de hembras anidadoras y su progenie. Aun sin contar con el genotipo de los padres potenciales, es posible estimar la frecuencia de paternidad múltiple (Jones y Avise 1999; Emery *et al.* 2001).

En el trabajo de campo (temporadas de anidación 98-99 y 99-2000) se colectó sangre de 109 hembras adultas, para estimar las frecuencias alélicas. De diez de estas hembras se obtuvieron muestras de sangre de la progenie inmediatamente después de su emergencia (entre 49 y 57 días después de la anidación), las tortugas adultas muestreadas fueron registradas a lo largo de la temporada de anidación con la finalidad de observar el número de eventos de anidación en la temporada y obtener muestras de cada nido. La estrategia de colecta esa representada en la Figura 2.3.

En las dos temporadas de anidación se obtuvieron diferentes tipos de muestra, el primer año se lograron coleccionar muestras de varios eventos de anidación mientras que en la segunda temporada se coleccionaron muestras de un solo evento de anidación.

#### *Extracción de DNA*

La extracción del DNA se realiza empleando el protocolo propuesto por FitzSimmons (1997). Se puede partir de ~20  $\mu$ l de sangre o de ~50  $\mu$ l de sangre

---

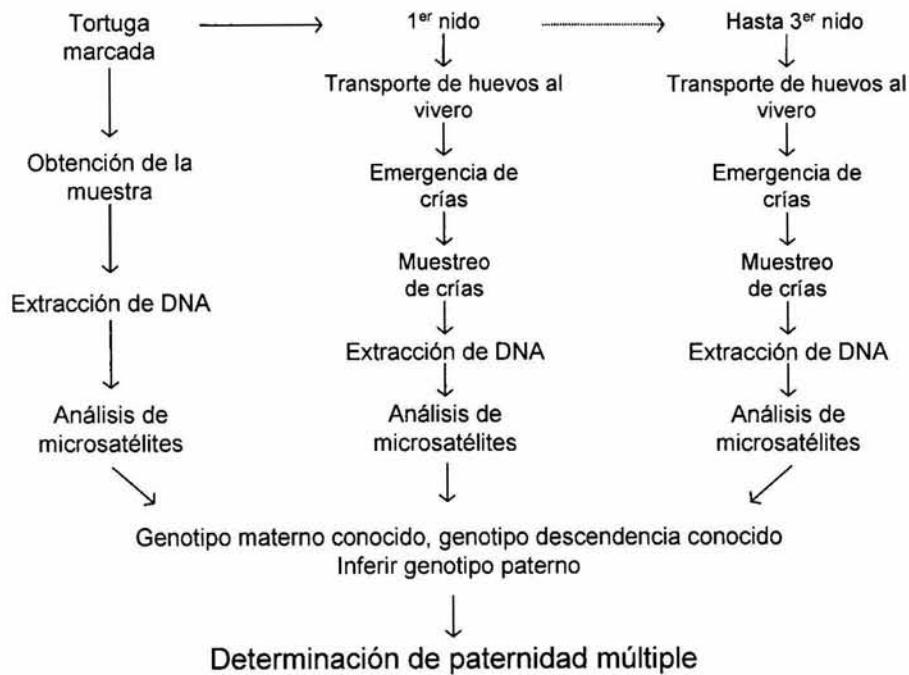
en solución amortiguadora lítica. La sangre es mezclada con 300  $\mu$ l de solución de extracción (Apéndice I) y proteinasa K para obtener una concentración final de 150  $\mu$ g/ml en un vial de 1.5 ml; se incuba de una a tres horas a 60° C realizando inversiones ocasionales de los viales. Las proteínas son precipitadas con la adición de 150  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M y refrigeración a -70° C por 20 minutos; se centrifuga a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4° C; se transfiere el sobrenadante a un vial limpio; el DNA es precipitado adicionando 1 ml de etanol al 95 % frío y refrigerando a -70° C por 20 minutos (o toda la noche). La muestra se centrifuga a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4° C y el etanol es eliminado por inversión evitando perder la pastilla (ésta no siempre es visible). Finalmente se adicionan 600  $\mu$ l de etanol frío al 70 % y se centrifuga a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El etanol se elimina por inversión de los viales, y la pastilla se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 50  $\mu$ l de agua bidestilada desionizada. 8 $\mu$ l de este DNA son sujetos a electroforesis en mini geles de agarosa al 1.4 %, teñidos con bromuro de etidio, y analizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### *Amplificación de microsatélites.*

La amplificación de los microsatélites se realizó con los oligonucleótidos (marcados con un fluoróforo) reportados por FitzSimmons (1997) diseñados para una población de tortuga verde *Chelonia mydas* de Australia. Tabla 2.1.

Las concentraciones de reactivos son: 200  $\mu$ M DNTPs; 1.5 mM MgCl; 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido; 1.5 unidades de *Taq* polimerasa, 2  $\mu$ l de DNA templado

en un volumen final de 25  $\mu$ l. El programa de temperaturas en el que se amplifican los microsatélites tiene 5 pasos distintos. (1) 94° C por 3 minutos, (2) 94° C por 10 segundos, (3) 57° C por 10 segundos, (4) 72° C por 10 segundos y (5) 72° C por 5 minutos (del paso 2 al 4 se repite 30 veces). 8  $\mu$ l del producto de esta reacción fueron sometidos a electroforesis en mini geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio, y observados bajo un transiluminador de luz ultravioleta para verificar la amplificación del fragmento esperado.



**Figura 2.3.** Estrategia empleada para la obtención de muestras de tortugas adultas y etapas posteriores del proyecto, para lograr la determinación de paternidad múltiple.

La electroforesis para separar los alelos de cada genotipo se realizó en un equipo automatizado (ABI 3100) de 16 capilares sometiendo a electroforesis un microlitro del producto de amplificación siguiendo las instrucciones del fabricante. La asignación de tamaño de los alelos se realizó con el software Genotyper versión 3.7 Applied Biosystems Corporation.

**Tabla 2.1.** Secuencia de los pares de oligonucleótidos empleados para amplificar los microsatélites diseñados por FitzSimmons (1997), Cm representa que el oligonucleótido fue diseñado originalmente para *Chelonia mydas*, Cc para *Caretta caretta*. Las letras y F y R diferencian a los oligonucleótidos "forward" y "reverse" respectivamente.

Oligonucleótido	Secuencia (5' ⇒ 3')
Cm 3-F	AATACTACCATGAGATGGGATGTG
Cm 3-R	ATTCTTTTCTCCATAAACAAGGCC
Cm 72-F	CTATAAGGAGAAAGCGTTAAGACA
Cm 72-R	CCAAATTAGGATTACACAGCCAAC
Cc 7-F	TGCATTGCTTGACCAATTAGTGAG
Cc 7-R	ACATGTATAGTTGAGGAGCAAGTG
Cm 84 -F	TGTTTTGACATTAGTCCAGGATTG
Cm 84 -R	ATTGTTATAGCCTATTGTTTCAGGA

### Análisis estadísticos

Se calculó la capacidad de detección de paternidad múltiple para cada locus (d) y entre los dos loci (D) y la probabilidad de que dos individuos de la población compartan un mismo genotipo (Westneat *et al.* 1987; Hanotte *et al.* 1991).

La probabilidad para detectar paternidad múltiple de cada locus (d) se calculó con la siguiente fórmula:

$$d = 1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$$

Donde:

$$a_x = \sum_{i=1}^n p_i^x ; \text{ y } p_i \text{ es la frecuencia relativa de los alelos.}$$

La probabilidad de detectar paternidad múltiple con varios loci (D) se calculó con la siguiente fórmula:

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

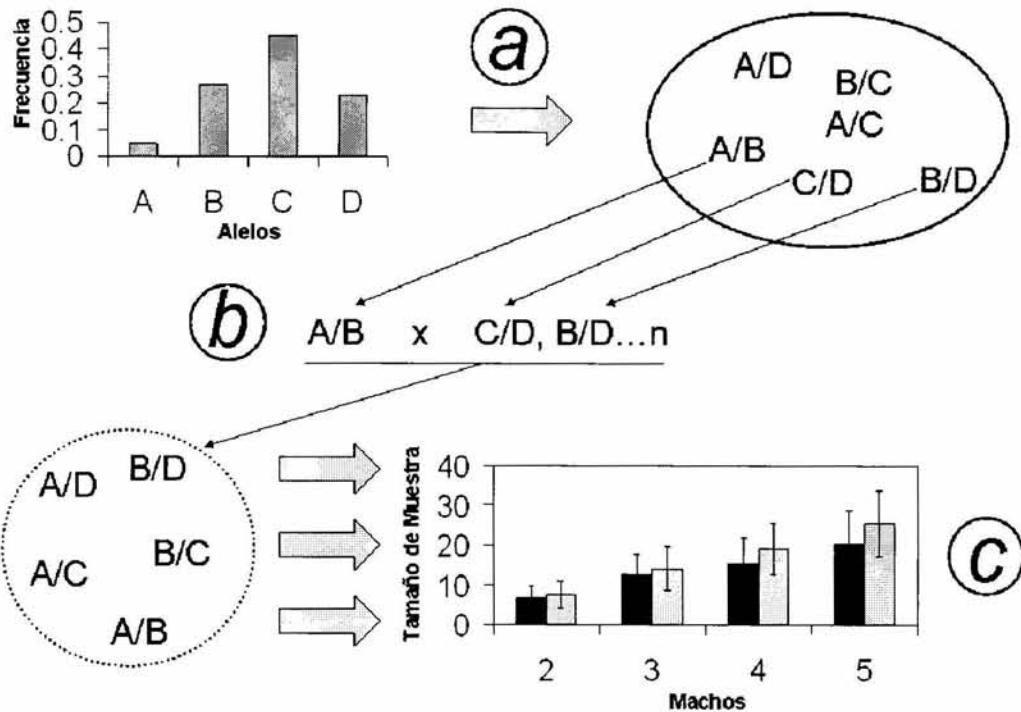
La probabilidad de encontrar dos genotipos idénticos en la población se obtiene con la fórmula:

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

Donde, p es la frecuencia de cada uno de los n alelos en cada loci

*Determinación del tamaño mínimo de muestra necesario para detectar la contribución de n genotipos paternos*

Se estimó el tamaño mínimo de muestra necesario para detectar  $n$  genotipos paternos empleando el algoritmo desarrollado por DeWoody *et al.* (2000) en el que a partir de las frecuencias alélicas de una muestra de la población se generaron genotipos diploides al azar, que son apareados para generar progenies de  $n$  individuos (65 en el caso de la TVPO) de medios hermanos con la contribución de  $n$  genotipos. Esta progenie simulada es "muestreada" para identificar el número de individuos necesarios para detectar la participación de  $n$  individuos. Al repetir este proceso miles de veces es posible inferir el número promedio de muestras requeridas para detectar la presencia de  $n$  genotipos no compartidos en un nido, (ver Figura 2.4). Esta estrategia ha sido implementada en el programa Matlab (DeWoody *et al.* 2000) lo que facilita la generación de réplicas múltiples para establecer el tamaño de muestra necesario para detectar con certidumbre la paternidad múltiple.



**Figura 2.4.** Estrategia para determinar el tamaño de muestra por nido. a) Con base en la distribución de frecuencias de alelos en la población se generan genotipos al azar. b) De la población de genotipos generados se selecciona un genotipo materno y  $n$  genotipos paternos generando progenies. c) De las progenies generadas se muestrea desde 1 a  $n$  genotipos para identificar cuantos genotipos han de muestrearse para detectar la presencia de uno a  $n$  genotipos paternos.

*Estimación de número de progenitores involucrados en la progenie*

Suponiendo que todas las crías de un nido comparten maternidad y con base en los patrones de herencia mendeliana de los alelos, es posible determinar el número mínimo de genotipos paternos involucrados en la fertilización de un nido. Para cada locus, la progenie hereda un alelo materno, un alelo paterno y todos los miembros de la progenie han de tener uno de los dos alelos de origen materno y al menos uno obtenido del grupo de alelos paternos. Los alelos maternos pueden detectarse con base en su elevada frecuencia en la progenie (cuando se desconoce el genotipo materno). Los alelos paternos son derivados



---

por exclusión sin que el patrón de herencia pueda explicarse con una hipótesis.

Por ejemplo.

- i. Genotipo materno  $A/A$  y genotipo en la progenie  $A/B$  el alelo  $B$  es de origen paterno y en este caso se infiere un genotipo paterno  $B/B$  o  $B/X$  donde  $X$  es un alelo no representado en la progenie.
- ii. Genotipo materno  $A/A$  y genotipos en la progenie  $A/B$ ,  $A/C$ , los alelos  $B$  y  $C$  son de origen paterno compatible con distintos escenarios: a) Un genotipo paterno  $B/C$ , b) Dos genotipos paternos, uno  $B/B$  y otro  $C/C$ , c) Dos genotipos paternos uno  $B/X$  y otro  $C/X$  donde el alelo  $x$  representa alelos no identificados en la progenie.

A pesar de la incapacidad para asociar un patrón de genotipos en progenie a una sola hipótesis, es posible inferir la hipótesis más probable con base en la frecuencia de composición genotípica en la progenie.

En este trabajo se empleó el programa GERUD 1.0 (Jones 2001) que permite determinar el número mínimo de machos que contribuyen en la progenie y permite reconstruir los genotipos paternos basándose en la distribución de frecuencias alélicas por locus de marcadores codominantes polimórficos.

## Resultados

### *Muestras obtenidas*

Se analizaron un total de 371 crías, de 16 nidos depositados por 10 hembras anidadoras en dos temporadas de anidación (5 por temporada) (Tabla 2.2.). En promedio se colectaron 23.2 crías por nido (intervalo 12-49) lo que representa el 35 % del tamaño promedio de cada nido.

**Tabla 2.2.** *Número de marca de cada tortuga adulta de la que se obtuvo sangre, así como el número de crías muestreadas de los distintos nidos ( $N_1$ ,  $N_2$  y  $N_3$ ), Hembras de la serie 200 son de temporada 98-99 y la serie 1200 son de la temporada 99-2000.*

Hembra	$N_1$	$N_2$	$N_3$	Total de crías muestreadas.
212	34	18	33	85
221	27			27
234	12	24		36
239	18	15	14	47
251	23	28		51
1200	15			15
1201	27			27
1202	49			49
1203	20			20
1207	14			14
Total				371

*Probabilidad de detección de paternidad múltiple*

La probabilidad de detección de paternidad múltiple, calculada con base en los genotipos multiloci analizados fue muy alta ( $D = 0.999$ ), y la probabilidad de detectar dos genotipos idénticos para los cuatro loci fue de  $2.5 \times 10^{-9}$ , con un intervalo de  $1.1 \times 10^{-2}$  a  $4.2 \times 10^{-3}$  para cada uno de los cuatro loci (Tabla 2.3.), esto implica que tendrían que colectarse varios millones de tortugas para encontrarse dos genotipos idénticos. Esto demuestra que el sistema de detección empleado es robusto.

**Tabla 2.3.** Locus, número de alelos en cada locus y probabilidad de detección de alelos de distintos padres ( $d$ ) por locus, empleando los 4 loci ( $D$ ) y la probabilidad de que se encuentren dos individuos con el mismo genotipo en la población.

Locus	No. alelos	$d$	Probabilidad de genotipos idénticos
cm3	38	0.8869	$2.1 \times 10^{-2}$
cm72	45	0.9298	$2.3 \times 10^{-3}$
cc7	40	0.9050	$4.2 \times 10^{-3}$
cm84	20	0.8438	$1.1 \times 10^{-2}$
Todos los loci	35.75	0.9999 (D)	$2.5 \times 10^{-9}$

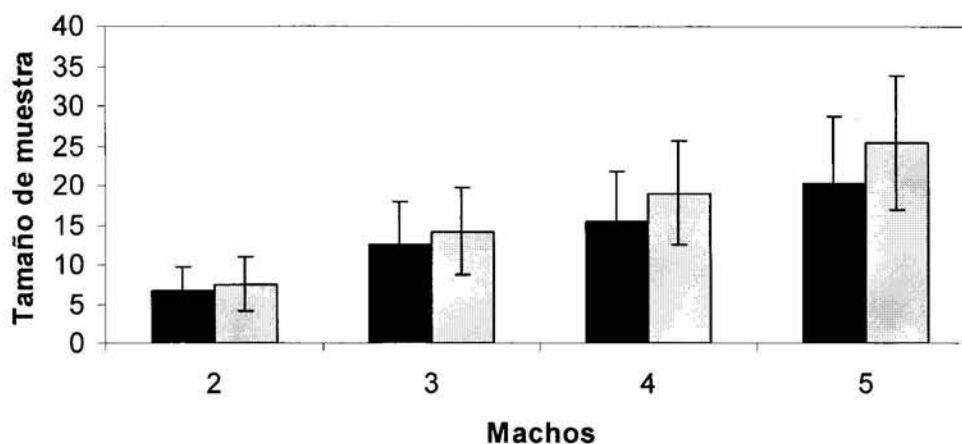
*Estimación del tamaño de muestra mínimo por nido para detectar la contribución genética de machos múltiples*

A partir de las simulaciones realizadas, fue posible determinar: i) El tamaño de muestra requerido para detectar los alelos de los progenitores no compartidos ( $n$ ). ii) El tamaño de muestra requerido para detectar los todos los tipos de

gametos generados por los genotipos de progenitores no compartidos ( $n^*$ ) y *iii*) El error estándar de ambos parámetros (Tabla 2.4.; Figura 2.5.).

**Tabla 2.4.** Resultados de la simulación del tamaño de muestra por nido promedio necesario para detectar los alelos de dos a cinco machos ( $n$ ) y los gametos generados por entre dos y cinco machos ( $n^*$ ) y el error estándar de cada promedio.

Machos	$n \pm ES$	$n^* \pm ES$
2	6.66 $\pm$ 3.21	7.54 $\pm$ 3.40
3	12.44 $\pm$ 5.39	14.14 $\pm$ 5.53
4	15.49 $\pm$ 6.32	19.06 $\pm$ 6.63
5	20.24 $\pm$ 8.44	25.39 $\pm$ 8.44



**Figura 2.5.** Gráfica con los resultados de la simulación del tamaño de muestra por nido promedio necesario para detectar los alelos de dos a cinco machos  $n$  (negro) y los gametotipos de dos a cinco machos  $n^*$  (gris). Las barras representan el error estándar de cada promedio.

Se observó que el número de crías necesarias para detectar los alelos aportados hasta por 5 machos es menor al valor promedio del número de crías muestreadas por nido (promedio 23.2) y que con el número inferior de crías muestreadas por nido (12 crías de la hembra 234, nido uno) es posible detectar la contribución de hasta 3 machos. Esto confirma que el tamaño de muestra

analizado por nido, es adecuado para detectar genéticamente el sistema de apareamiento múltiple de la TVPO.

*Frecuencia de paternidad múltiple en la tortuga verde del Pacífico oriental*

Con los genotipos obtenidos de la progenie se contabilizaron los alelos de origen paterno asociados a cada nido, de los que se estimó el número mínimo y máximo de progenitores involucrados en cada evento de anidación (Tabla 2.5).

Con la reconstrucción realizada de los genotipos involucrados en la fertilización de los nidos con el programa GERUD 1.0 (Jones 2001) es posible determinar la frecuencia de paternidad de cada genotipo hipotético en cada nido (Figura 2.6).

**Tabla 2.5.** Número de alelos paternos por nido para cuatro loci (Cm3, Cm72, Cc7, Cm84). Mín-Máx representa el número mínimo y máximo de genotipos paternos involucrados en la fertilización de un nido. Los números en las celdas representa el tamaño de cada alelo en pb.

Hembra	Nido	Cm3	Cm72	Cc7	Cm84	Min-Max
212	I	169, 173, 181, 205	221, 271	201, 219	343, 335	2-4
	II	173, 181	271, 221	201, 219	343, 335	1-2
	III	173, 181	271, 221	201, 219	343, 335	1-2
221	I	165, 173, 181	222, 257, 267, 279, 291	171, 185, 191, 205	326, 356	3-5
234	I			217, 229	332, 340	1-2
	II			217, 229	332, 338, 340	1-3
239	I			179, 195, 197, 201	323, 347, 349, 353,	2-4
	II			179, 195, 197, 201	323, 343, 347	2-4
	III			195, 197, 201	323, 343, 347	2-3
251	I	161, 171, 173, 179	165, 255, 257, 265, 281	187, 193, 201, 217	331, 335, 343, 351	3-5

*(cont. Tabla 2.5)*

Hembra	Nido	Cm3	Cm72	Cc7	Cm84	Min-Max
	II	171, 173, 179	257, 265, 281	187, 193, 201, 217	331, 335, 343, 349, 351	3-5
1200	I	169, 171, 173, 189	257, 271, 285	174, 183, 199, 213	343, 347, 359	2-4
1201	I	157, 169, 187	243, 255, 267, 287	169, 191, 197	335, 343, 349	2-4
1202	I	163, 205	279, 281	183	329, 335	1-2
1203	I	169, 171, 199	221, 257	171, 197	325, 337	2-3
1207	I	163, 171, 193, 205	253, 273, 277, 285	179, 195, 197, 207	323, 341, 343, 349, 351	3-5

De los 16 nidos analizados 12 (75%) presentaron paternidad múltiple. De los nidos con paternidad múltiple, cuatro (25%) fueron fertilizados por dos machos, cinco (31%) por tres machos y tres (19%) por cuatro machos, los cuatro restantes (25%) presentaron a toda su progenie fertilizada por un mismo macho.

Con respecto a la frecuencia de contribución del semen de un macho para fertilizar los huevos del nido el valor promedio va de 6 % a 82 %, con un valor promedio de 34 %.

Cuando se analiza el patrón de contribución de los machos en los  $n$  eventos de anidación de las hembras (Tabla 2.6), se evidencia que al menos el semen de un macho es utilizado para fertilizar todos los eventos de anidación muestreados en una sola temporada (hembras 212, 234, 239, 251).

El semen de una misma combinación de dos machos es detectado en no más de dos eventos de anidación consecutivos (Tabla 2.6; hembra 251 nidos uno y dos). El semen de una misma combinación de tres machos es detectado en no más de dos eventos de anidación consecutivos (Tabla 2.6; hembra 239 nidos dos y tres).

**Tabla 2.6.** Hembra anidadora, número de nido en la temporada de anidación, Identificación del padre putativo ( $\sigma^1, \sigma^2... \sigma^n$ ) en términos de genotipo hipotético de cada macho para los cuatro loci analizados y porcentaje de crías fertilizadas de cada nido por cada macho. La numeración de los machos involucrados con cada hembra es independiente.

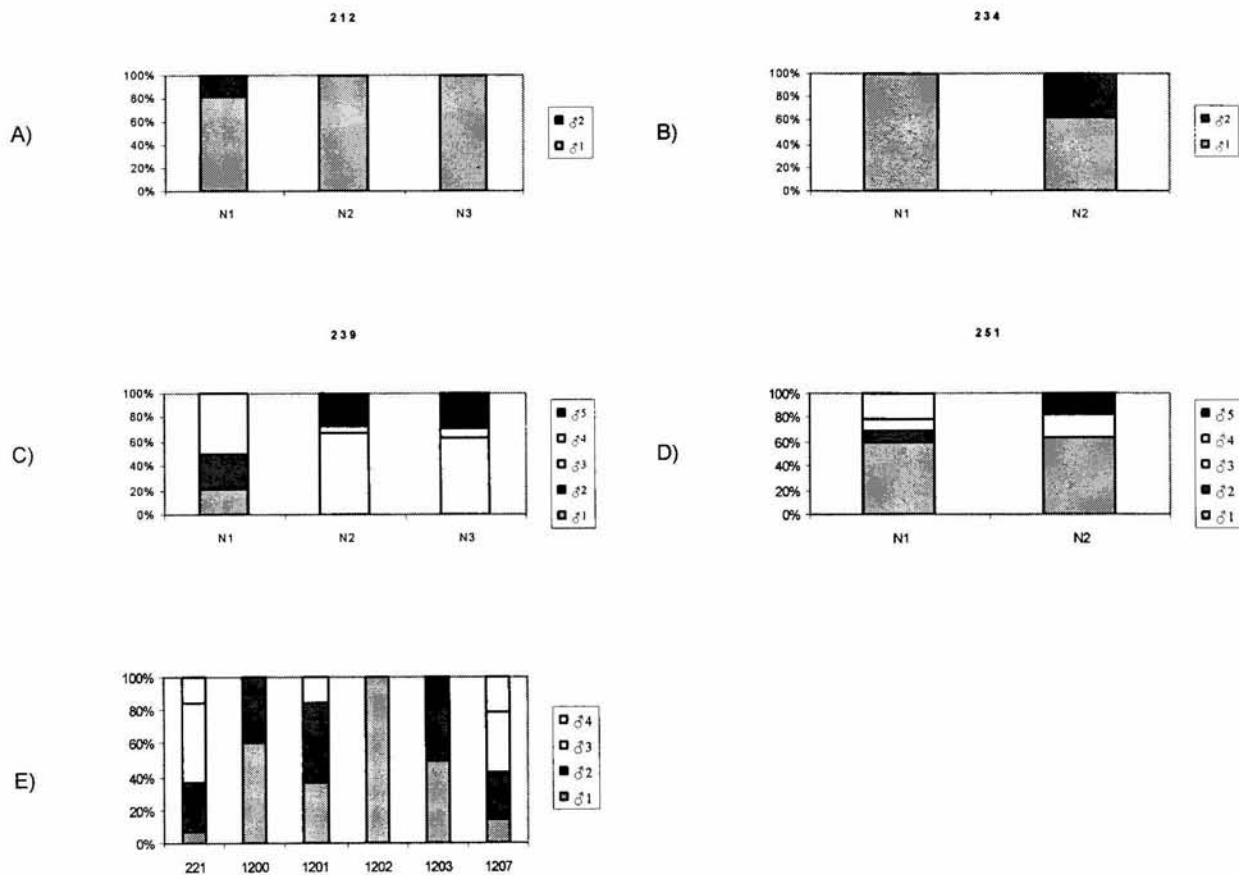
Hembra	Nido (n)	Genotipo	Cm3	Cm72	Cc7	Cm84	% No crías
212		♀	173/205	257/265	183/203	347/347	
	I (34)	$\sigma^1$	173/181	271/221	201/219	343/335	82
		$\sigma^2$	205/169	221/271	219/201	343/343	18
	II (18)	$\sigma^1$	173/181	271/221	201/219	343/335	100
III (33)	$\sigma^1$	173/181	271/221	201/219	343/335	100	
221		♀	165/173	257/283	171/183	326/348	
	I (27)	$\sigma^1$	165/165	267/257	171/191	326/356	7
		$\sigma^2$	165/191	267/222	185/205	326/356	30
		$\sigma^3$	165/191	267/291	171/185	326/356	48
		$\sigma^4$	191/181	279/257	171/205	326/356	15
234		♀			171/179	326/338	
	I (12)	$\sigma^1$			217/229	340/332	100
	II (24)	$\sigma^1$			217/229	340/332	63
$\sigma^2$				229/217	340/338	38	
239		♀			179/199	343/349	
	I (18)	$\sigma^1$			201/201	347/347	22
		$\sigma^2$			201/179	349/353	28
		$\sigma^3$			197/195	343/323	50
	II (15)	$\sigma^4$			179/179	347/347	6
		$\sigma^3$			197/195	343/323	67
		$\sigma^5$			201/197	347/343	27
	III (14)	$\sigma^4$			179/179	347/347	7
$\sigma^3$				197/195	343/323	64	

(cont. Tabla 2.6)

Hembra	Nido (n)	Genotipo	Cm3	Cm72	Cc7	Cm84	% No crías
251	I (23)	♂5			201/197	347/343	29
		♀	161/179	253/255	181/195	347/349	
		♂1	173/179	281/257	187/193	351/343	61
		♂2	173/179	165/255	187/217	351/331	9
		♂3	171/161	281/255	193/217	335/343	9
1200	II (28)	♂4	171/179	281/265	201/217	335/331	21
		♂1	173/179	281/257	187/193	351/343	64
		♂4	171/179	281/265	201/217	335/331	18
		♂5	173/179	281/281	193/187	343/349	18
		♀	169/201	239/285	193/197	323/339	
1201	I (15)	♂1	169/171	271/257	174/213	347/359	60
		♂2	189/173	271/285	199/183	347/343	40
		♀	161/165	261/289	177/179	323/325	
1202	I (27)	♂1	157/169	243/287	197/169	343/349	37
		♂2	169/187	255/267	197/191	343/335	48
		♂3	169/187	255/267	197/191	335/349	15
1203	I (49)	♀	171/181	255/277	201/201	341/341	
		♂1	163/205	279/281	183/183	329/335	100
1207	I (20)	♀	161/169	253/287	169/177	331/347	
		♂1	199/169	221/257	197/171	337/325	50
		♂2	171/169	257/257	197/171	337/325	50
		♀	181/171	247/257	173/195	341/341	
1207	I (14)	♂1	171/171	273/273	195/179	323/349	14
		♂2	171/193	285/285	197/207	341/343	29
		♂3	205/163	285/253	195/197	323/341	36
		♂4	193/163	285/277	197/197	351/343	21



Con respecto a la frecuencia de contribución de un macho en nidadas consecutivas puede observarse un incremento en la frecuencia en las siguientes hembras: hembra 212, el macho uno; hembra 239, el macho tres entre nidos uno y dos y los machos cuatro y cinco entre nido dos y tres; hembra 251, el macho uno entre nidos uno y dos.



**Figura 2.6.** Porcentaje de participación de genotipos paternos en la fertilización de los n eventos de anidación de las hembras (A, B, C, D). El inciso E presenta la frecuencia de seis hembras anidadoras de las que solo se tiene análisis de un evento de anidación, en esta figura la leyenda del numero de machos es independiente para cada hembra.

La aparición de nuevos machos involucrados en la fertilización de los huevos se observó en las siguientes hembras: hembra 234, el macho dos en el

---

nido dos; hembra 239, los machos cuatro y cinco en el nido dos, que permanecen hasta el nido tres; hembra 251, el macho cinco en el nido dos.

La desaparición de machos involucrados previamente en la fertilización, se observó en las siguientes hembras: hembra 212, el macho dos; hembra 239, el macho dos; hembra 251, los machos dos y tres.

Reducción en la frecuencia de machos involucrados en la fertilización de huevos se observó en la hembra 234, el macho uno; hembra 239, el macho tres entre los nidos dos y tres; hembra 251, el macho cuatro entre nidos uno y dos.

No se encontró evidencia de que los genotipos de machos involucrados en la fertilización de uno o más nidos de una hembra fertilizaran huevos depositados por otra hembra.

---

## Discusión

### *Análisis estadísticos*

En los trabajos donde se analiza el sistema de apareamiento, se usa regularmente el estimador ( $d$ ) para detectar la probabilidad de detección de paternidad múltiple para cada locus (Raymond y Russet 1995). Sin embargo, este estimador puede dar resultados inconsistentes cuando se consideran escenarios de bajo nivel de polimorfismo y bajo circunstancias particulares, como las siguientes.

- a) Si se analiza una población con un locus en el que solo hay dos alelos, la probabilidad de detectar paternidad múltiple es igual a cero, suponiendo que para detectar paternidad múltiple se requiere poder identificar al menos tres alelos de origen paterno en la progenie. Sin embargo, el valor que se obtiene para  $d$  es igual a 0.1875.
- b) La probabilidad de detectar paternidad múltiple aumenta como función del tamaño de muestra de cada nido. Sin embargo el tamaño de muestra analizado no es considerado para la estimación de ( $d$ ).
- c) El valor de  $d$  depende también del genotipo de los progenitores involucrados. Esta información no es considerada para la obtención de ( $d$ ).
- d) El valor ( $d$ ) se incrementa, en relación con el número de machos involucrados en la fertilización de la progenie, pero este parámetro no es considerado.

---

Por lo anterior, se deduce que el estimador ( $d$ ) es sencillo y ofrece una alternativa para estimar la probabilidad para detectar paternidad múltiple. Sin embargo, es deseable generar un estimador que incluya más parámetros de manera que, sea sensible a las condiciones particulares del sistema de estudio.

#### *Tamaño de muestra necesario para detectar paternidad múltiple*

Una limitante del estudio de sistemas de apareamiento en especies con progenie numerosa (por ejemplo, artrópodos, peces, anfibios) es el alto costo de una evaluación exhaustiva de la progenie. En el caso de la TVPO una hembra puede contribuir con más de 180 crías en una temporada de anidación (promedio de 2.6 eventos de anidación por temporada con un promedio de ~70 huevos por nido) y suponiendo un costo de análisis en el laboratorio por muestra de aproximadamente \$US 15 empleando 4 loci de microsatélites se requerirían más de \$US 2,700 para analizar la frecuencia de paternidad múltiple de una sola hembra, considerando únicamente el trabajo de laboratorio. Con la simulación desarrollada por DeWoody *et al.* (2000) realizada en este trabajo es posible definir con certidumbre el tamaño de muestra necesario sin requerir un análisis exhaustivo de la progenie. En el caso de organismos en los que la progenie no es numerosa (<10) no es necesario usar esta estrategia.

#### *Escenarios posibles de sistemas de apareamiento para tortuga verde del Pacífico oriental*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con varios de los escenarios planteados o variantes de estos (ver Figura 2.2.).

---

La hembra 212 tiene un sistema de apareamiento similar al escenario número tres en el que se usa el semen de un mismo macho en los distintos eventos de anidación, y adicionalmente se observa la contribución genética de un segundo macho. En este caso particular se puede inferir que el semen del macho dos (Figura 2.6 Inciso A) fue usado en una el primer evento de anidación debido a dos posibilidades: *i)* El semen de este macho es resultado de un evento de apareamiento anterior al primer evento registrado en este trabajo. *ii)* la cantidad de semen aportada por este macho fue menor a la del macho 1 (Figura 2.6. Inciso A).

La hembra 234 tiene un patrón similar al tercer escenario con la variante que en este caso se observa la contribución genética de un segundo macho hasta el segundo evento de anidación, macho 2 (Figura 2.6. Inciso B).

La hembra 239 y 251 tienen un patrón de fertilización congruente con la propuesta del quinto y tercer escenario, de manera que en ambos casos se observa la presencia del uno o varios genotipos en todos los eventos de anidación (Figura 2.5. Macho dos inciso C. Machos uno y cuatro, inciso D) y la contribución de machos en un solo evento de anidación (Figura 2.5. Machos uno y tres, inciso C y machos dos tres y cinco, inciso D) así como la de machos que se observan en más de un evento de anidación (Figura 2.5. Machos cuatro y cinco, inciso C).

De los análisis realizados con eventos únicos de anidación, hembras 221, 1200, 1201, 1202, 1203 y 1207, se observan comportamientos de paternidad múltiple congruente con los diversos patrones de paternidad múltiple observados en las hembras con múltiples eventos de anidación, pero al carecer de múltiples

---

eventos de anidación, no pudo evaluarse la variación en la frecuencia de paternidad múltiple a lo largo de la temporada.

#### *Diferencias en la frecuencia de paternidad múltiple*

Las diferencias en la frecuencia de participación de los genotipos en los distintos eventos de anidación pueden ser explicados por varios elementos.

##### *a) Contribución relativa de semen cada macho durante la cópula*

Escenario en donde la cantidad de semen de cada macho en el tracto genital de una hembra, puede relacionarse positivamente con respecto al tiempo y/o número de cópulas con un macho, y volumen de semen eyaculado por cada macho (Otronen 1997).

Se ha observado que el sesgo en la paternidad está correlacionado con la estructura de los genitales, tamaño corporal del macho y la producción de químicos seminales (Jennions y Petrie 2000).

En reptiles se ha sugerido que el almacenamiento de semen es un evento común (Girling 2002) permitiendo el almacén de semen hasta por 7 años, como ocurre en la serpiente *Acrochordus javanicus* (Mangusson 1979). En *C. mydas* se ha detectado evidencia de capacidad de las hembras para almacenar semen obtenido en los eventos de cópula (Chaves *et al.* 2000) pero sugiriendo que este almacén solo se presenta en periodos tan cortos como una temporada reproductiva (Miller 1996). En las descripciones anatómicas del tracto genital femenino de tortugas marinas no se menciona la presencia de estructuras que

---

faciliten el mantenimiento de los espermatozoides (Wyneken 2001), pero en descripciones del tracto reproductivo de tortugas de agua dulce, se han identificado túbulos para almacenamiento de semen (Gist y Congdon 1998).

*b) Competencia espermática*

Al presentar las TVPO una conducta polígama y al observarse la potencial capacidad de almacén de semen (en una temporada de anidación) en las tortugas del género *Chelonia*. Se cubren los supuestos para que se presente competencia espermática. Uno de los resultados de la competencia espermática es el cambio en la frecuencia de espermatozoides disponibles de los machos involucrados en la fertilización de los óvulos (Sivinnski 1984). Sin embargo, para demostrar la presencia de competencia espermática involucrada en el sesgo de participación en la fertilización de óvulos hace falta realizar investigación en sistemas *in vitro* similares a lo realizado por Moore *et al.* (1999).

*c) Elección críptica por la hembra*

Se ha sugerido, que posterior a la cópula, las hembras tienen la capacidad de sesgar la participación de los machos de un sistema poliándrico para fertilizar los óvulos (Birkhead y Pizzari 2002). Se ha demostrado que las hembras pueden identificar el genotipo de los espermatozoides (Vaquier 1998) abriéndose la posibilidad de elegir preferentemente el semen de un macho. Hay evidencia de que la elección críptica puede llegar a niveles sorprendentes. En el caso del ctenóforo *Beroë ovata* se ha observado elección críptica a nivel subcelular del pronúcleo femenino hacia los pronúcleos masculinos cuando hay polispermia (Carré y Sardet 1984 en Birkhead y Pizzari 2002). En tortugas marinas no se ha

identificado ninguno de estos mecanismos lo cual, evidencia un fértil campo de investigación.

*Procesos asociados a los patrones observados de paternidad múltiple*

Al encontrarse en la población analizada presencia y ausencia de paternidad múltiple se sugieren varios procesos asociadas a esta variación.

*a) Procesos dependientes del ambiente*

En estos puede considerarse, la abundancia de machos que puede mostrar una variación espacial y temporal importante. Particularmente en la playa de Colola se ha observado una variación importante en el número de machos satélites durante la cópula, que puede ser usado como indicador de la abundancia de machos. En la temporada de 1999 se observaron hasta nueve machos satélites por mancuerna (Martínez 2003), mientras que en la temporada 2000 el grupo más grande de machos satélites que se observó fue de tres (Martínez *et al.* datos no publicados). Esta variación puede deberse a procesos cíclicos del tamaño de la población reproductiva que visita las playas cada año, proceso que ha sido reportado en múltiples playas para la población de hembras anidadoras (Hirt 1997). Si los procesos que afectan las fluctuaciones en la abundancia de hembras y machos esta desacoplado (que la población de machos visitantes un año sea baja y la de hembras sea alta), puede sesgar fuertemente la disponibilidad de machos para la cópula. Sin embargo, no existe evidencia empírica que apoye esta idea, evidenciándose la falta de conocimiento sobre la dinámica poblacional y conducta reproductiva de los machos, debido a la dificultad logística para obtener información biológica de este sexo.



---

El patrón observado en las hembras 212 y 251 (Figura 2.6. Incisos A y D), pueden asociarse con la disminución de genotipos involucrados en la fertilización de eventos consecutivos lo cual puede ser un indicador indirecto de fluctuación del número de machos disponibles para la cópula.

*b) Procesos dependientes de la elección de la hembra.*

En este caso es la hembra que mediante mecanismos pre-cópula o pos-cópula modifica la frecuencia de paternidad múltiple. Con respecto a este escenario tenemos que en las cuatro hembras en las que se analizan múltiples eventos de anidación se observa la participación de más de un macho en la temporada reproductiva y la elección de fertilización con un solo macho en algún evento de anidación.

Si efectivamente el cambio de frecuencia de paternidad múltiple depende de la elección de la hembra, habría que explicar que la reducción o incremento y el cambio de estrategia en la frecuencia de paternidad múltiple, genere un incremento de adecuación del genotipo ejecutante. Aunque explicar la variación en la frecuencia de paternidad múltiple de las hembras requeriría generar múltiples hipótesis para explicar el valor adaptativo de esta variación, la explicación más sencilla que se sugiere, es que las hembras con su capacidad de elección crítica, optan por eliminar la paternidad múltiple cuando se aparean con algún macho que posee características deseables evaluadas desde el nivel fenotípico externo hasta niveles de reconocimiento celular o subcelular (ver Carré y Sardet, 1984 en Birkhead y Pizzari 2002), o cuando la abundancia de machos sea baja.

---

La poliandria ha sido asociada con potenciales beneficios directos e indirectos (Birkhead y Pizzari 2002). En términos de adecuación para las tortugas marinas poliándricas, se pueden identificar los siguientes beneficios:

*i)* Beneficios de fertilización. La poliandria garantiza disponibilidad de semen.

*ii)* Cambio de la pareja. La poliandria permite obtener una nueva y “mejor” pareja. En las tortugas marinas existe la posibilidad de que las hembras puedan evaluar las características del macho, lo cual puede relacionarse con las pautas de rechazo que se realizan de manera discrecional (Martínez 2003), permitiendo a las hembras aparearse con un “mejor” macho. Para someter a escrutinio esta hipótesis se requiere, capturar a los machos involucrados en las cópulas y observar si algún fenotipo en particular es favorecido para las cópulas. Este experimento se planeó para el periodo del trabajo de campo, sin embargo no se logró establecer las condiciones para realizarlo (captura de machos, marcaje con pintura, periodos de observación de conducta de apareamiento).

*iii)* Evitar riesgo por acoso. El frenesí de los machos por acceder a la cópula puede generar que sea más costoso rechazarlos que dejarlos copular y posteriormente si es el caso, seleccionar negativamente su semen (elección críptica). Con las interacciones de apareamiento observadas durante la realización de este trabajo, se observó que las hembras anidadoras salen a la playa con marcas de mordidas en las áreas donde hay piel expuesta (región cervical, aletas anteriores y posteriores), y las lesiones en la parte anterior del caparazón generadas por los machos durante la cópula, lo cual es reflejo de lo

---

intenso que son las interacciones asociadas al apareamiento, incluyendo las de rechazo.

*iv) Reducción del impacto de una “mala” elección.* A pesar de la capacidad de las hembras para seleccionar a los machos, cabe la posibilidad de una “mala” evaluación, de modo que asignar todo el potencial reproductivo a un solo macho puede ser arriesgado, particularmente en el caso de la TVPO en la que se presentan eventos de anidación cada 3 años en promedio. En una estrategia poliándrica este riesgo disminuye.

Como beneficios indirectos la poliandria genera en la TVPO se pueden mencionar los siguientes.

*i) Progenie con altos valores de diversidad genética.* Cuando la progenie es resultado de fecundación poliándrica, los niveles de diversidad genética son mayores y esto puede estar asociado a valores más altos de adecuación de la progenie (Jennions y Petrie 2000).

*ii) Progenie atractiva.* Si las hembras tienen varios machos para elegir el fenotipo-genotipo más atractivo para copular y/o fertilizar a sus óvulos, la progenie resultante de esta interacción heredará las características de genotipo-fenotipo que fueron seleccionadas por la hembra, asegurando una mayor adecuación de la misma.

Aunque la poliandria también ha sido asociada a costos, como el incremento de riesgo de depredación al distraerse los organismos con los múltiples apareamientos, o la posibilidad de enfermedad por contagio sexual. En el caso de la TVPO no se pueden identificar costos de un sistema de apareamiento poliándrico, lo que es congruente con los niveles de paternidad

---

múltiple reportados en este trabajo, pero no inconsistente con los trabajos reportados de otras especies en los que los niveles de paternidad múltiple son bajos. Particularmente en el caso del trabajo con *Ch. mydas* de Australia, habría que explicar por qué aun con una conducta de apareamiento poliándrica no existe un sistema poliándrico genético.

De la reconstrucción de genotipos, no se observa la participación de un mismo macho fertilizando la progenie de más de una hembra lo que implica, la carencia de un macho dominante en el área de apareamiento y/o una alta disponibilidad de machos, descartándose la posibilidad de estructuras complejas asociadas al apareamiento (por ejemplo, "leks" o "landmarks") que podrían sugerirse de la observación empírica del sistema de apareamiento conductual.

*Paternidad múltiple de la tortuga verde del Pacífico oriental vs. otras tortugas marinas.*

Al compararse los resultados de este trabajo, con otros sobre frecuencia de paternidad múltiple en tortugas marinas (Tabla 2.7) es evidente que no es posible identificar que la frecuencia dependa de la especie analizada. En el caso del género *Chelonia* aun empleando la misma técnica y con 3 loci idénticos se puede observar un cambio importante en la frecuencia de paternidad múltiple en el sistema de apareamiento genético con un mismo sistema de apareamiento etológico. En el caso de *D. coriacea*, aunque no es posible evaluar el sistema de apareamiento etológico, el sistema de apareamiento genético muestra una notable diferencia. En el caso de *C. caretta* se observa la misma frecuencia de paternidad múltiple, aun empleando técnicas con un nivel de resolución distinto.

**Tabla 2.7.** Tabla en la que se resume la información de trabajos de frecuencia de paternidad múltiple de tortugas marinas (modificado de Moore y Ball 1999). Técnica empleada (mini o microsatélites); %PM Porcentaje de paternidad múltiple; N/H número de nidos y número de hembras analizadas.

Cita	Especie	Localidad	Técnica	%PM	N/H
Parker <i>et al.</i> (1996)	<i>C. mydas</i>	Tortuguero, Costa Rica	Mini	50	3/3
Ireland <i>et al.</i> (2003)	<i>C. mydas</i>	Isla Ascensión Reino Unido	Micro	100	3/3
Lee y Hays (2004)	<i>C. mydas</i>	Isla Ascensión Reino Unido	Micro	60	18/18
<b>Este trabajo</b>	<b><i>C. mydas</i></b>	<b>Michoacán, México</b>	<b>Micro</b>	<b>75</b>	<b>16/10</b>
FitzSimmons (1998)	<i>C. mydas</i>	Queensland, Australia	Micro	0.3	22/13
Kichler <i>et al.</i> (1999)	<i>L. kempii</i>	Tamaulipas, México	Micro	56	35/26
Hoekert <i>et al.</i> (2002)	<i>L. olivacea</i>	Surinam	Micro	25	8/8
Rieder <i>et al.</i> (1998)	<i>D. coriacea</i>	Guanacaste, Costa Rica	Micro	N	2/2
Dutton y Davis (1998)	<i>D. coriacea</i>	St. Croix, EUAVI	Micro	N	?/4
Crim <i>et al.</i> (2002)	<i>D. coriacea</i>	Playa Grande Costa Rica	Micros	16	50/20
Harry y Briscoe (1988)	<i>C. caretta</i>	Queensland, Australia	Prot	33	45/24
Bollmer <i>et al.</i> (1999)	<i>C. caretta</i>	Melburne Beach EUA	Micro	33	3/3

---

Con esta evidencia resulta relevante ahora evaluar si la variación en la frecuencia de paternidad múltiple se debe a la elección de la hembra con independencia de las condiciones ambientales o es resultado de las condiciones ambientales siendo las hembras elementos pasivos en la determinación de frecuencia de paternidad múltiple.

Se sabe que las tortugas se mantienen reproductivamente activas por muchos años. Particularmente se han identificado hembras del género *Chelonia* que han permanecido reproductivamente activas por al menos 23 años (Hirth 1997). Si consideramos que en promedio cada tres años las hembras visitan las playas de anidación, esto implica al menos siete temporadas reproductivas para cada hembra, de modo que aun en el caso de que no exista paternidad múltiple en una temporada, globalmente la progenie generada por una hembra será fertilizada por al menos siete machos distintos, lo que en términos de vida reproductiva puede generar niveles considerables de diversidad genética, con respecto al observada en organismos semélparos, en los que se reporta paternidad múltiple, como el salmón del Atlántico *Salmo salar* (Martinez *et al.* 2000).

En los casos en que la paternidad múltiple es poco frecuente, cabe preguntarse ¿Por qué la hembra realiza múltiples cópulas? ¿Qué función tienen? En las lagartijas unisexuales del género *Cnemidophorus* se ha encontrado que la cópula sirve para estimular el desarrollo de los óvulos (Moore *et al.* 1985); posiblemente las múltiples cópulas de las tortugas marinas tengan una función similar. Para reunir evidencia que permita resolver estas interrogantes es necesario continuar reuniendo información sobre la frecuencia de paternidad

---

múltiple en las tortugas marinas y asociarla con información de conducta reproductiva y adecuación de la progenie generada en escenarios contrastantes.

A la luz de toda la investigación realizada sobre el sistema de apareamiento de las tortugas marinas, es deseable ahora enfocar la investigación para determinar: la conducta reproductiva de una hembra en distintas temporadas de anidación. Establecer si existe variación temporal en la frecuencia de paternidad múltiple acoplada a eventos ecológicos y/o ambientales, realizar el análisis con un mayor número de nidos por evento anidatorio de todas las hembras y buscar evidencia empírica de la asociación entre paternidad múltiple con respecto a la adecuación inclusiva y de la progenie.

Se ha sugerido que la paternidad múltiple puede ser un elemento importante para determinar la diversidad genética de las especies, y existe al menos un trabajo en el que se asocia a la paternidad múltiple como responsable de la manutención de niveles de diversidad genética elevados en poblaciones con tamaños poblacionales reducidos (Martinez *et al.* 2000). Si la frecuencia de paternidad múltiple es una característica sujeta a variación de los elementos demográficos como la disponibilidad de machos para la cópula derivado de sus dinámica poblacional y elementos ambientales como “El Niño”, que puede modificar la disponibilidad de nutrimentos en aguas tropicales afectando indirectamente la dinámica de migraciones en las poblaciones reproductivas.

Esto implica que la variación en paternidad múltiple puede ser empleada como una respuesta de las hembras frente a condiciones ambientales particulares. Someter a escrutinio esta hipótesis es solo posible con la acumulación de información sobre el sistema de apareamiento de diversos organismos en

---

condiciones ecológicas ambientales contrastantes, o sometiendo a condiciones experimentales contrastantes a organismos de fácil mantención en laboratorio.



---

## CONCLUSIONES

### Capítulo I

- I. Los valores de diversidad haplotípica ( $h = 0.48$ ) obtenidos a partir de secuencias de la región control del mtDNA de la población de TVPO de la costa michoacana, se encuentra cercano a los valores máximos dentro del intervalo reportado para otras tortugas marinas.
- II. La diversidad nucleotídica ( $\pi = 0.0036$ ) obtenida, a partir de secuencias de la región control del mtDNA de la población de TVPO de la costa michoacana, representa un valor relativamente pequeño, lo que sugiere que el origen de los haplotipos encontrados en baja frecuencia son resultado de eventos de mutación ocurridos en la región, mas que resultado de inmigración.
- III. Los valores de diversidad genética de microsatélites nucleares (promedio  $H_{obs}$  (todos los loci)  $> 0.95$ , y  $H_{exp} > 0.87$ ;) son tan altos como los valores de diversidad para poblaciones de tortuga verde australianas con tamaños que varían entre miles a decenas de miles de hembras anidadoras por temporada.
- IV. No se observaron desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg Para los tres loci de microsatélites analizados en las poblaciones anidadoras de TVPO.
- V. A pesar de la reducción sufrida en la población de la TVPO de Michoacán, en décadas pasadas, no se detecta evidencia genética que sugiera el paso de la misma por un cuello de botella.
- VI. No se detectó diferenciación genética entre las playas de anidación de la TVPO en el estado de Michoacán (distancia máxima de 45 Km. entre

- 
- localidades), en marcadores con herencia materna (mtDNA), ni con marcadores de herencia biparental (microsatélites).
- VII. Los valores de flujo génico ( $N_m$ ) detectados entre las playas de anidación de la TVPO fueron altos ( $N_m > 3.5$  para mtDNA y  $N_m > 28$  para microsatélites), sugiriendo un intercambio de individuos entre estas localidades en escalas de tiempo evolutivo, lo que potencialmente permitiría el restablecimiento a largo plazo si alguna población particular se extinguiese. Sin embargo, la experiencia sufrida por otras colonias anidadoras de TVPO (Ej. Oaxaca, México) evidencia que la velocidad de extinción de poblaciones locales generada por el hombre, supera la capacidad de las colonias vecinas para recolonizar las poblaciones extirpadas.
- VIII. Para fines de conservación se debe considerar a las poblaciones anidadoras de TVPO del estado de Michoacán, como una sola unidad de manejo.
- IX. Se estimó un tamaño efectivo de población histórico de hembras de TVPO ( $N_{ef}$ ) de entre 1,900 a 2,300, que es lo suficientemente alto para garantizar el futuro de esta población desde el punto de vista de la diversidad genética.

## Capítulo II

- I. El estimador para evaluar la capacidad de un sistema multiloci para detectar la presencia de paternidad múltiple ( $d$ ) presenta inconvenientes que sugieren tomar con cautela los resultados obtenidos. Es necesario por lo tanto, desarrollar nuevos estimadores que incluyan los parámetros asociados al

- 
- sistema de apareamiento a analizar (frecuencia y número de alelos de la población, genotipo de los parentales, tamaño de muestra analizado).
- II. Es posible obtener información robusta sobre el sistema de apareamiento de tortugas marinas, sin ser necesario el análisis de toda la progenie generada. Específicamente cuando se emplea un sistema altamente polimórfico (ej. microsatélites con más de 35 alelos en promedio) es suficiente coleccionar 20 individuos de la progenie para detectar la participación de hasta cinco machos.
  - III. El sistema de apareamiento etológico poliándrico observado en la TVPO del estado de Michoacán, es congruente con el sistema de apareamiento genético observado.
  - IV. La variación observada en la frecuencia de paternidad múltiple de la TVPO del estado de Michoacán, puede ser resultado de procesos de competencia espermática, o elección críptica de la hembra, lo que genera un cambio en la frecuencia de la proporción de la progenie que es fecundada por cada macho a lo largo de los distintos eventos de anidación que se reportan en una temporada.
  - V. El sistema de apareamiento poliándrico etológico y genético, evidencia que este sistema ofrece más beneficios que costos a la TVPO en el estado de Michoacán.
  - VI. No se observa la participación del genotipo de un macho involucrado en la fertilización de la progenie de más de una hembra lo que descarta la existencia de un macho que acapare las cópulas en población anidadora de TVPO de la playa de Colola, Michoacán.

- 
- VII. No es posible explicar la variación en la frecuencia de paternidad múltiple encontrada entre especies de tortugas marinas por un componente taxonómico, lo que sugiere explorar otras hipótesis como responsables de esta variación, como por ejemplo proporción sexual operacional y condiciones ambientales particulares.
- VIII. La ausencia o escasa paternidad múltiple en una temporada reproductiva, como se ha reportado para poblaciones de *C. mydas* y *Dermochelys coriacea* puede no tener un impacto drástico sobre la diversidad genética generada por la progenie de una tortuga, si se considera el número de eventos reproductivos que puede tener una tortuga marina en toda su vida.

---

**LITERATURA CITADA.**

- Alvarado J y Figueroa A (1990) The ecological recovery of sea turtles of Michoacán México. Special attention the black turtle (*Chelonia agassizii*). Final report U.S. Fish and Wildlife Service, New México, pp 51.
- Alvarado J y Figueroa A (1991) Comportamiento reproductivo de la tortuga negra *Chelonia agassizii*. *Ciencia y Desarrollo* **17**:43-49.
- Alvarado J y Figueroa A (1992) Recapturas post-anidatorias de hembras de tortuga marina negra (*Chelonia agassizii*) marcadas en Michoacán, México. *Biotropica* **24**: 560-566.
- Armour J; Santos A; Miles S; Williams L y Badge M (1999) Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. En *Microsatellites Evolution and Applications*. Goldstein, D. y Schlötterer Ch. Editores. Oxford University Press. Oxford. pp 24-34.
- Beaumont M A y Bruford M W (1999). Microsatellites in conservation genetics. En *Microsatellites Evolution and Applications*. Goldstein, D. y Schlötterer Ch. editores. Oxford University Press. Oxford. pp 165-182.
- Birkhead T R y Pizzari T (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nature reviews*. **3**:262-273.
- Bollmer J L; Irwin M E; Rieder J P y Parker P G (1999) Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia* **1999**:475-478.
- Booth J; Peters J A (1972) Behavioral studies on the green turtle *Chelonia mydas* in the sea. *Animal Behaviour* **20**:808-812.

- 
- Bowen W B; Meylan A B; Ross J P; Limpus C J; Balazs G H y Avise C J (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* **46**:865-881.
- Bowen W B; Nelson S W y Avise C J (1993) A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **90**:5574-5577.
- Bowen B W; Abreu-Grobois F A; Balazs G H; Kamezaki N; Limpus C J y Ferl R J (1995) Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **92**: 3731-3734.
- Bowen B W y Karl S A (2000) Meeting Report: Taxonomic status of the east Pacific green turtle (*Chelonia agassizii*). *Marine Turtle Newsletter* **89**:20-22.
- Caetano-Anolles G y Gresshoff P M (1994) Staining nucleic acids with silver: An alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes Magazine* **45**:13-21.
- Chassin-Noria O (2002) Estructura genética y sistemática molecular de la tortuga negra *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758) del estado de Michoacán México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 95 pp.
- Chaves A; Arana M y Du Toit L (2000) Primary evidence of sperm storage in the ovaries of the olive ridley marine turtle (*Lepidochelys olivacea*). En: *Proceedings of the eighteenth international sea turtle symposium*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-436, pp. 123.

---

CITES The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. As adopted by the Conference of the Parties, valid from 19 July 2000.

Clifton K; Cornejo D y Felger S (1982) Sea turtles of the pacific coast in México. en: Biology and Conservation of sea turtle. Bjornadal K. editor. Smithsonian Institution Press. Washington D.C. 199-209.

Crim J L; Spotila L D; Spotila J R; O'Connor M; Reina R; Williams C J y Paladino F V (2002) The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* **11**: 2097-2106.

Delgado C T (2003) Historia de vida y conservación de la población de tortuga negra (*Chelonia agassizii*) que anida en Michoacán. M C Tesis. Facultad de Biología, UMSNH. 109 pp.

Dewoody J A; Dewoody D D; Fiumera A C y Avise J C (2000) On the number of reproductives contributing to a half-sib progeny array. *Genetical Research Cambridge* **75**:95-105.

Dutton P H; Davis T G y Owens D (1996) Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**:511-521.

Dutton P H y Davis S K (1998) Use of molecular genetics to identify individuals and infer mating behavior in leatherbacks. *Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Byles R y Fernandez Y. Compiladores. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412. pp. 42.

- 
- Emery A M; Wilson I; Craig J S; Boyle P R y Noble L R (2001) Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and developmental plasticity in squid. *Molecular Ecology* **10**:1265-1278.
- Estoup A y Cournet J (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. En *Microsatellites Evolution and Applications*. Goldstein, D y Schlötterer Ch. Editores. Oxford University Press. Oxford. pp 49-65.
- Felger R S; Clifton K y Regal P J (1976) Winter dormancy in sea turtles: independent discovery and exploitation in the Gulf of California by two local cultures. *Science* **191**:283.
- Figueroa A y Alvarado J (1990) Morphometric comparison of the *Chelonia* populations of Michoacán, México and Tortuguero, Costa Rica. En Richardson J I editor. *Proceedings of the Tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Tec. Mem. NMFS-SEFC. pp. 179-182.
- FitzSimmons N (1996) Use of microsatellite loci to investigate multiple paternity in marine turtles. Found in *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA. Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. pp. 69-77.
- FitzSimmons N N (1997) Male marine turtles: gene flow, philopatry and mating systems of the green turtle *Chelonia mydas*. Ph D thesis, University of Queensland, Australia 241 pp.
- FitzSimmons N N (1998) Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* **7**:575-584.



- 
- Frankham R; Ballou J D y Briscoe D A (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. New York. 617pp.
- Frazer N B y Ladner R C (1986) A growth curve for green sea turtles *Chelonia mydas* in the U.S. virgin islands , 1913-1914. *Copeia* **1986**:798-802.
- Futuyma J D (1998) Evolutionary Biology. Sinauer Associates Sunderland Massachusetts. 763 pp.
- Gist H D y Congdon J D. (1998) Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *The Journal of Experimental Zoology* **282**:526-534.
- Graves J R; Scallan H M y Rowe S (1991) Extra pair paternity in the shag, *Phalacrocorax aristotelis*, as determined by DNA fingerprinting. *Journal of Zoology* **226**:399-408.
- Griffith S C; Owens I P; Thuman K A (2002) Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* **11**:2195–2212.
- Girling J E (2002) The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *Journal of Experimental Zoology* **293**:141-70.
- Gyllensten U B; Jakobsson S y Temrin H (1990) No evidence for illegitimate young in monogamous and polygynous warblers. *Nature*. **343**:168-170.
- Hancock J M (1999) Microsatellites an other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En *Microsatellites evolution and applications*. Goldstein D y Schlötterer Ch. editores. Oxford University Press New York. pp 1-9.
- Hanotte O; Burke T; Armour J y Jefreys A (1991) Hypervariable Minisatellite DNA Sequences in the Indian Pea fowl *Pavo cristatus*. *Genomics* **9**: 587-597.

- 
- Harry J L y Briscoe D A (1988) Multiple paternity in the loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Journal of Heredity* **79**:96-99.
- Hirth F H (1997) Synopsis of the Biological Data on The Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). Biological Report 97 (1) FWS-US. pp120.
- Hoekert W E J; Neufeglise H; Schouten A D; Menken S B J (2002) Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* **89**:107-113.
- Huston K A (1998) Statistical Analysis of STR Data. *Profiles in DNA* **103**:14-15.
- Ireland J S; Broderick A C; Glen F; Godley B J; Hays G C; Lee P L M y Skibinski D O F (2003) Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **291**:149-160.
- Jennions M D y Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **75**:21-64.
- Jones A G (2001) GERUD1.0 a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multilocus DNA data. *Molecular Ecology Notes* **1**:215-218.
- Jones A G y Avise J C (1997) Microsatellite análisis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Molecular Ecology* **6**:203-213.
- Kamezaki N y Matsui M (1995) Geographic variation in the skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*, with a taxonomic discussion. *Journal of Herpetology* **29**: 1-60.

- 
- Karl S A; Bowen B W y Avise J C (1992). Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* **131**:163-173.
- Karl S A y Bowen W B (1999) Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: Molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology* **13**:990-999.
- Kichler K L; Holder M T; Davis S K; Marquez R y Owens D W (1999) Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology* **8**:819-830.
- Lee P L M y Hays G C (2004) Polyandry in a marine turtle: Females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**:6530-6535.
- Levinson G y Gutman G A (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**:203-221.
- Luikart G y England P (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution*. **14**:253-256.
- Lutcavage M E y Lutz P L (1997) Diving Physiology. En Lutz P L y Musick J A Editores. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp. 277-296.
- McDonald B y Potts W K (1994) Cooperative display and relatedness among males in a lek-mating bird. *Science* **226**:1030-1032.
- Mangusson W E. 1979. Production of an embryo by *Acrochordus javanicus* isolated for seven years. *Copeia* **1979**:744-745.

- 
- Martinez J L; Moran P; Perez J; De Gaudemar B; Beall E y Garcia-Vazquez E (2000) Multiple paternity increases effective size of southern Atlantic salmon populations. *Molecular Ecology* **3**:293-298.
- Martínez M M (2003) Repertorio del comportamiento y patrones sociales durante el cortejo y apareamiento de *Chelonia agassizii* Tesis. UMSNH. México 49 pp.
- Meylan A B; B W Bowen y Avise J C (1990) A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* **248**: 724-727.
- Miller J D (1997) Reproduction in sea turtles. En Lutz P L y Musick J A Editores. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp. 51-81.
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. **9**:373-375.
- Moore H D; Martin M y Birkhead T R (1999) No evidence for killer sperm or other selective interactions between human spermatozoa in ejaculates of different males in vitro. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* **266**:2343-50.
- Moore M C; Whittier J M; Billy A J y Crews D (1985) Male-like behavior in an all-female lizard: Relationship to ovarian cycle. *Animal Behavior* **33**: 284-289.
- Moore M K y Ball R M (2002) Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology* **11**:281-288.

- 
- Otronen M (1997) Sperm numbers, their storage and usage in the fly *Drymomysa anilis*. Proceedings of the royal society of london Series B **264**:777-782.
- Owens W D y Ruiz G J (1980) New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. Herpetologica **36**: pp 17-20.
- Roman J y Palumbi S R (2003) Whales before whaling in the North Atlantic. Science **301**:508-510.
- Parker P G; Waite T A y Peare T (1996) Paternity studies in animal opulations. En: Molecular Genetic Approaches in Conservation. Smith T B y Wayne R K. Editores. Oxford University Press, New York. pp 413-423.
- Patridge L y Halliday T (1984) Mating Patterns and Mate Choice. En. Behavioral Ecology an Evolutionary Approach. Krebs J R y Davies N B Editores. Blackwell Science Ltd UK. pp 222-250.
- Peare T (1994) Multiple paternity in green turtles (*Chelonia mydas*): conservation implications. En: Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-351, 115-118 pp.
- Primmer C; Møller P y Ellegren H (1995) Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. Molecular Ecology **4**:493-498.
- Pritchard P C (1999) Status of the black turtle. Conservation Biology **13**:1000-1003.
- Queller D C (1996) The measurement and meaning of inclusive fitness Animal Behaviour **51**: 229-232.

- 
- Raymond M y Russet F (1995) GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **80**: 248-249.
- Rieder J P; Parker P G; Spotila J R e Irwin M E (1998) The mating system of the leatherback turtle: a molecular approach. En: *Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Byles R y Fernandez Y. Compiladores. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412. p. 120-121.
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*. **88**:221-228.
- Roman J y Palumbi S R (2003) Whales before Whaling in the North Atlantic. *Science*. **301**:508-510.
- Schlötterer C (1998) Microsatellites. En: *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Hoeltzel A R editor. Oxford USA. Pp 237-261.
- Seminoff J A; Alvarado J; Delgado C; Lopez J L y Hoeffler G (2002) First direct evidence of migration by an East Pacific green sea turtle from Michoacán, México to a feeding ground on the Sonoran coast of the Gulf of California. *Southwestern Naturalist* **47**:314-316.
- Sivinski J (1984) Sperm in competition. En: *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Smith R L. Editor. Academic Press, New York. pp. 85-115.
- Soulé M E (1980) Thresholds for survival: Mantaining fitness and evolutionary potential. En: *Conservation Biology. An Evolutionary-Ecological*

- 
- Perspective. Soulé M E y Wilcox B A. Editores. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. pp 151-169.
- Vaquier V D 1998. Evolution of Gamete Recognition Proteins. *Science* **281**:1995-1998.
- Valle G (1993) TA-repeat microsatellite are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. *Yeast* **9**:753-759.
- Westneat D (1987) Extra-pair fertilizations in a predominantly monogamous birds: genetic evidence. *Animal Behaviour* **35**:877-886.
- Westneat D F; Fredrick P C y Haven R (1987) The use of genetic markers to estimate the frequency of successful alternative reproductive tactics. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **21**:35-45.
- Wilson I (2000) Parentage version 1.0. Users guide. University of Aberdeen King's College. UK.
- Wyneken J (2001) The Anatomy of Sea Turtles. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470. pp 172.

---

## APÉNDICE I

### *Electroforesis en geles de poliacrilamida*

Los alelos de los microsatélites seleccionados para este trabajo tienen tamaños de entre 100 y 300 pares de bases y las diferencias en el tamaño de los alelos puede ser de tan solo 2 bases (los microsatélites de tortuga empleados son dinucleótidos repetidos). Para diferenciar entre fragmentos de DNA con 2 bases de diferencia es necesario realizar geles de poliacrilamida. En los trabajos de microsatélites de tortugas marinas para visualizar los distintos alelos de microsatélites se emplea una marca radioactiva. Si bien la marca con radioactividad tiene ventajas (permite detectar cantidades pequeñas de DNA), también representa problemas de manejo, particularmente con los desechos. Para el desarrollo de este trabajo se emplea la tinción con plata para visualizar los alelos. Los límites de detección de ácidos nucleicos con tinción de plata para un fragmento de 100 pb es de 0.3 pg./mm<sup>2</sup> y de un fragmento de 1 kb de 3 pg/mm<sup>2</sup>. Estos límites de detección son similares a los obtenidos con métodos radioactivos o fluorescentes (Caetano-Anollés 1994). Y superiores a los límites de detección del bromuro de etidio (10 ng de DNA bajo luz ultravioleta con longitud de onda corta).

Los geles de poliacrilamida se corren en una cámara vertical con cristales de 20 X 36 cm. y espaciadores de 0.75 mm, se preparan 35 ml de poliacrilamida al 8% con: urea, 16.8 gr.; TBE 10 X 3.5 ml; acrilamida-bisacrilamida al 30% 9.3 ml; agua bidestilada 9 ml; y se polimeriza con 262.5 µl de persulfato de amonio al 10% y 35 µl de TEMED. Se realizar una pre-corrída del gel durante 1 hora a 500 V (17 mA).



---

Para correr las muestras es necesario mezclar 2  $\mu$ l de producto de PCR con 6  $\mu$ l de colorante (200  $\mu$ l colorante de Sigma cat. B3269 y 600  $\mu$ l formamida), calentar las muestras a 95 °C por 2 minutos y transferir a hielo. Cargar los 8  $\mu$ l de muestra y correr a 220 V voltaje constante durante 18 hrs.

### *Tinción con plata*

El protocolo empleado para la tinción con plata es el siguiente: transferir el gel a una bandeja de plástico con una solución de ácido acético glacial al 7.5% durante 30 minutos en un agitador orbital; lavar el gel con agua destilada en agitación durante 2 minutos, repetir este paso 2 veces; Poner el gel en una solución de plata ( ) durante 1 hora en agitación; lavar el gel con agua destilada 5 segundos; sumergir en solución reveladora (ver tabla pagina siguiente) aproximadamente 4 minutos. En cuanto se hacen evidentes las bandas, transferir el gel a una solución de ácido acético glacial al 7.5 % para detener el revelado. Los geles son fotografiados con un sistema digital y almacenados en refrigeración.

---

*Soluciones empleadas en los protocolos de este trabajo.*

---

Solución	Composición
Solución amortiguadora lítica (para preservar sangre)	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM NaCl; 2 % SDS
Solución saturada sal- DMSO (para preservar tejido sólido)	250 mM EDTA pH 8.0; 20% DMSO; NaCl hasta saturación (230 gramos de NaCl para un litro).
Solución de extracción DNA	10 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl y 0.1 % SDS
TBE 10 X	90 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8.0.
solución reveladora	30 g/l carbonato de sodio Anhidro; 3 ml/l de formaldehído y 0.5 ml de tiosulfato de sodio de una solución de 0.2 g / 50 ml agua
solución de plata	1 g/l de nitrato de plata; 1.5 ml de formaldehido; aforar a un litro con agua destilada

---