



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Unidad Académica Mazatlán



Universidad Nacional Autónoma de México

“Estructura genética poblacional de la tortuga verde, *Chelonia mydas* en el Caribe mexicano determinada por análisis de secuencias del ADN mitocondrial”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
(Biología Marina)

presenta

NADIA ALEJANDRA PÉREZ RÍOS

Director de Tesis:

DR. F. ALBERTO ABREU-GROBOIS

Comité Tutorial:

DR. MANUEL URIBE ALCOCER

DR. BRUNO GÓMEZ GIL RODRÍGUEZ SALA

DR. HUGO AGUIRRE VILLASEÑOR

DRA. ALEJANDRA GARCÍA GASCA

Mazatlán, Sinaloa, Septiembre del 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Primeramente dedico esta tesis a los principales miembros de mi familia: Julio quien me ha brindado muchos momentos especiales y he recibido su amor y apoyo; Aketzalí y Andrea, mis dos hermosas chiquitas, ustedes son el principal motivo para seguir adelante, gracias por aguantar las separaciones tan difíciles, las amo.

A mis padres: Francisca Ríos y Jaime Pérez, por darme la vida y la educación, y claro el apoyo que nunca me faltó, gracias mamá. También a Yafte por ser mi hermanito consentido y espero esto le sirva de ejemplo.

A los señores Gerardo Herrera y Yolanda Arriaga por el apoyo que nos brindaron durante la estancia en Mazatlán y en todo momento. A Carlos, Sonia, Mireya, Kenia y Kevin por compartir momentos felices.

A Beto, mi primo que sin su ayuda hubiera resultado difícil la realización de este proyecto. A mi tío Alejandro porque nunca me ha abandonado

A la familia Ríos Trujillo por tener su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Ha concluido una gran etapa de mi vida (parecía “interminable”) y quiero expresar mis sinceros agradecimientos a todos aquellos que de alguna u otra forma permitieron llevar a término esta tesis.

Agradezco principalmente a mi director de tesis Dr, Alberto Abreu Grobois, por su comprensión, apoyo y paciencia durante el desarrollo de la maestría y la tesis en particular. Fue un apoyo para el desarrollo y termino de este documento.

A los miembros de mí jurado (sin orden estricto), Dra. Alejandra García, Dr. Manuel Uribe, Dr. Hugo Aguirre y el Dr. Bruno Gómez Gil, a todos ellos les agradezco por sus comentarios, aportes, críticas y recomendaciones hechas a mi tesis, que individualmente enriquecieron el documento final.

Por su gran amistad, a los compañeros del laboratorio (sin orden estricto), Mary Herrera por la amistad y apoyo en las técnicas para concluir mi tesis, Olivia Millán por amistad, comentarios y ayuda, Ricardo Colima por su amistad, sin olvidarme de Ariel Ruiz quien trajo una alegría contagiosa y también por sus atinados comentarios.

A CONACYT, por su apoyo y facilitar la estancia en el posgrado durante la realización de la maestría.

A Germán Ramírez por su apoyo y ayuda en la realización un programa de cómputo, el cual permitió sacar adelante este trabajo, también a Carlos Suárez por su apoyo en cómputo.

A Margarita Cordero por su apoyo incondicional tanto personal como en los trámites académicos.

A las familias Salgado, Ramírez-Alonso, Jasso-Hernández, por su apoyo, trato, atenciones y amistad, gracias por brindarme un ambiente familiar.

A Natalia Medina y Carmen Espinoza por su entrañable amistad que me ayudo a tener una vida más llevadera en este puerto.

A todos los compañeros de la maestría: Alondra, Gina, Leo, Joel, Martín, Claudia, Yahra, Asia, Miguel, Beto, Daniel, Manuel, Eynar, Carlos Illich. A todas las personas que contribuyeron en algo durante mi posgrado y que de alguna manera participaron con sus risas y aventuras en este camino.

Sin olvidar a Soledad y su hermano Juan con quienes compartimos como una familia.

A todos los profesores que participaron en mi enseñanza y que aportaron su granito de arena para ser mejor, les estoy muy agradecida.

También agradezco a toda mi familia que siempre estuvo apoyándome para salir adelante, los quiero enormemente.

1. INTRODUCCION	2
2. GENERALIDADES DE <i>CHELONIA MYDAS</i>	5
2.1. Taxonomía	5
2.2. Distribución mundial	6
2.3. Distribución en México.....	6
2.4. Ciclo de vida	6
2.4.1. Reproducción	7
2.4.2. Anidación	8
2.4.3. Alimentación	8
2.5. Estado de conservación.....	8
2.6. Genética de la conservación	9
3. ANTECEDENTES DE TRABAJOS MOLECULARES EN TORTUGA VERDE..	11
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos específicos	20
6. AREA DE ESTUDIO	21
7. METODOLOGIA.....	23
7.1. Obtención y preservación de muestras	23
7.1.1. Temporada 2005	23
7.1.2. Temporada 2006	23
7.2. Extracción y valoración del ADN	24
7.3. Amplificación de la región control.	25
7.4. Purificación y secuenciación	26
7.5. Diversidad genética intrapoblacional.....	27
7.6. Relaciones genealógicas entre secuencias.....	28
7.7. Diversidad genética interpoblacional	28
7.8. Reconstrucción de relaciones filogenéticas entre poblaciones	29
7.9. Aislamiento por distancia.....	29
7.10. Análisis de Rarefacción	29
7.11. Contribución de colonias mexicanas a hábitat de alimentación en el Atlántico.....	31
8.1. Composición haplotípica de las colonias	32
8.1.1. Temporada 2005	34

8.1.2. Temporada 2006	34
8.3. Relaciones genealógicas entre secuencias.....	38
8.4. Distribución geográfica de la variación genética.....	44
8.4.1. Diferenciación interpoblacional utilizando el estadístico F_{ST}	44
8.4.2. Diferenciación interpoblacional utilizando el estadístico Φ_{ST}	46
8.5. Flujo génico entre colonias.....	48
8.6. Estructura poblacional.....	48
8.7. Aislamiento por distancia.....	50
8.8. Análisis de Rarefacción	52
8.9. Impactos de la composición haplotípica en la precisión de las estimaciones de frecuencias.....	56
8.10. Contribución de colonias mexicanas a hábitats de alimentación en el Atlántico	61
9. DISCUSIÓN	64
9.1. Composición haplotípica	64
9.2. Diversidad genética intrapoblacional.....	66
9.3. Relaciones genealógicas entre secuencias.....	67
9.4. Diferenciación interpoblacional y unidades de manejo en el contexto regional	69
9.6. Aislamiento por distancia.....	71
9.7. Efectos de muestreo	72
9.8. Contribución de colonias mexicanas a hábitat de alimentación en el Atlántico.....	74
9.9. Las Corrientes marinas como facilitadoras de procesos evolutivos	76
10. CONCLUSIONES	79
10.1. Composición haplotípica de las colonias	79
10.2. Niveles de diversidad genética (h y pi)	79
10.3. Red de haplotipos.....	79
10.4. Efectos de muestreo	80
10.5. Estructura poblacional	80
10.6. Aislamiento por distancia.....	80
10.7. Contribución de las colonias del Caribe mexicano a sitios de alimentación en el Atlántico.....	81
11. RECOMENDACIONES.....	82
12. BIBLIOGRAFIA.....	83
12. ANEXOS.....	93

RESUMEN

Las contrastantes tendencias poblacionales en colonias de la tortuga verde del Atlántico, especie en peligro de extinción, resaltan la necesidad de identificar con precisión las unidades demográficas para diseñar estrategias de manejo acordes a la ubicación y dimensiones de amenazas a nivel regional y nacional. Para abordar esta problemática para la especie dentro del Caribe mexicano se analizó la variación genética en la región control del ADNmt con nuevos cebadores que amplifican unos 800 pb. Se analizaron 213 individuos de siete colonias de Quintana Roo para identificar las unidades poblacionales, comparar los niveles de diversidad genética a nivel regional y evaluar la contribución de poblaciones quintanarroenses a sitios regionales de alimentación. Identificamos nueve haplotipos, de los cuales cuatro (CM-A2, -A22, -A26 y -A28) son reportados por primera vez en hábitats de reproducción o del estado. Un nuevo polimorfismo en el segmento incrementado permitió subdividir el haplotipo CM-A1. Los análisis de diferenciación (estructura genética, flujo génico, rarefacción y análisis de varianza molecular) entre colonias indican que existe una sola unidad de manejo dentro del Caribe mexicano. Los valores de diversidad haplotípica (0.74 a 0.86) y nucleotídica (0.003 a 0.006), resultaron mucho mayores que los reportados para el resto del Atlántico y sugieren la ocurrencia de inmigraciones a partir de linajes diversos. El incremento de haplotipos asignables a la población de Quintana Roo mejoró la resolución del Análisis de Stock Mezclados y se encontró que su mayor contribución es a sitios de alimentación en Carolina del Norte, Florida y Barbados (20.4%, 9.0% y 5.7% respectivamente).

1. INTRODUCCION

Los trabajos precursores de genética molecular en tortugas marinas se remontan a Bonhome *et al.* (1987) quienes utilizaron alozimas para estudiar la tortuga verde *Chelonia mydas*. La escasa capacidad de resolución de esta técnica no permitió la detección de las diferencias encontradas más adelante. La implementación de metodologías para analizar la variación genética directamente en el ADN, inició con estudios de polimorfismos en las longitudes de fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés) aplicado por Bowen *et al.* (1992) a poblaciones de la tortuga verde. Incrementos importantes en la precisión del análisis surgieron a partir de la posibilidad de secuenciar regiones específicas del ADN, primordialmente dentro del ADN mitocondrial (ADNmt), gracias al desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica facilitó y abarató el estudio de la constitución genética de las poblaciones. En tortugas marinas se determinó la estructura genética de la tortuga verde en el Atlántico occidental (Encalada *et al.* 1996), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) en el Caribe (Bass *et al.* 1996), la laúd (*Dermochelys coriacea*) (Dutton *et al.* 1999) y la golfina (*Lepidochelys olivacea*) a nivel global (Bowen *et al.* 1998).

Otro tema abordado por técnicas moleculares, han sido las relaciones sistemáticas y evolutivas entre las poblaciones de tortugas marinas, que han estado sujetas a polémicas de difícil resolución debido a que los organismos presentan rasgos morfológicos extremadamente conservados y que no se prestan fácilmente a un análisis filogenético. A niveles superiores de clasificación taxonomica de los quelonios actuales, las herramientas moleculares han resuelto dudas sobre la singularidad específica de la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) con respecto a su especie hermana, la tortuga golfina (Bowen y Karl 1996); la mayor cercanía evolutiva de la tortuga carey, de hábitos espongióvoros, con la subfamilia Caretteni (que incluye el género *Caretta*) de hábitos carnívoros (Bowen *et al.* 1993); la confirmación de hibridación entre especies (inclusive entre diferentes géneros) de tortugas marinas: *Caretta* con *Chelonia*; *Caretta* con *Eretmochelys* y *Lepidochelys* con *Caretta* (Bowen y Karl 1996).

Otra aplicación de las técnicas moleculares ha sido en la identificación de las fuentes donde convergen varias poblaciones como en hábitats de alimentación o rutas migratorias (Broderick *et al.* 1994; Bowen *et al.* 1995; Bowen *et al.* 1996). Por ejemplo, se pudo demostrar que de las 1,000 caguamas capturadas incidentalmente al año por los palangres y

redes de deriva que varios países emplean en el Pacífico del Norte, el 95% nace en colonias japonesas y el resto en playas australianas (Bowen *et al.* 1995). Todas convergen para su desarrollo juvenil en la zona de alimentación localizada en aguas costeras de Baja California, México. Así, la jurisdicción sobre su conservación es compleja, ya que compete a los países que comparten la población en diferentes fases de su ciclo vital. Mientras tanto, los impactos causados deben analizarse en función de la frecuencia relativa de los stocks en la captura y de la condición de cada una de las colonias fuente. Sobre este punto se ha estimado una estabilidad actual relativa en la población anidadora de *Chelonia mydas* en Japón mientras que las anidaciones en Australia tienden hacia la baja. Sin embargo, para mantener niveles poblacionales saludables en ambos stocks es indispensable controlar la mortalidad de los juveniles en las pesquerías aludidas (Bolten *et al.* 1996).

Los niveles de flujo genético entre poblaciones también pueden ser evaluados por medio de marcadores moleculares, y es posible distinguir el flujo génico de las hembras del de los machos comparando los resultados de los estudios de diferenciación mediante loci nucleares (de herencia biparental) con los de loci mitocondriales (de herencia materna). Así, Karl *et al.* (1992) encontraron que mientras que las líneas maternas de las colonias reproductoras de la Isla Ascensión y de Surinam son distinguibles genéticamente, existe un reconocible flujo génico que afecta la composición de loci nucleares, sugiriendo un intercambio genético propiciado por el comportamiento promiscuo de machos, indistintamente de su colonia origen, sobre hembras fieles a sus sitios de anidación.

La tendencia de las hembras a regresar a su sitio natal para reproducirse (“filopatría”) es otro de los aspectos que han sido estudiados con marcadores moleculares. En términos genéticos, este fenómeno es validado en conjuntos de poblaciones donde las diferencias genéticas entre colonias que anidan en diferentes playas son significativas (Allard *et al.* 1994). Los estudios de genética en la tortuga verde (Encalada *et al.* 1996), la Carey (Bass *et al.* 1996) y la caguama (Bowen *et al.* 1994) han mostrado subdivisión genética entre colonias y, por ende, una marcada tendencia hacia la filopatría.

La conclusión general de resultados de diferenciación genética entre poblaciones de tortugas marinas indica la existencia de unidades reproductivamente independientes. Bajo este escenario, es poco probable que se de una recolonización natural sobre sitios de anidación donde hubieron poblaciones recientemente extirpadas, excepto después de cientos de

generaciones (Moritz *et al.* 2002). Para fines de conservación, la capacidad de las herramientas moleculares para la identificación de estas unidades reproductoras singulares (o stocks) dentro de uno o un conjunto de playas de anidación, en mezclas de poblaciones en hábitats de alimentación o en corredores migratorios, es su mayor y más valiosa contribución. El contar con la identificación de las unidades básicas, permite aplicar estrategias de manejo y conservación independientes acordes a la condición particular de cada unidad, y darles un seguimiento político y administrativo.

2. GENERALIDADES DE *Chelonia mydas*

2.1. Taxonomía

Las tortugas son reptiles, vertebrados que tienen piel con escamas, tienen pulmones y usan la luz solar para calentar sus cuerpos. Las tortugas se reproducen por medio de fertilización interna y depositan sus huevos en la arena.

Una característica única de la tortuga es su concha. Esta estructura esquelética es una cubierta armada protectora de los órganos vitales internos. La parte superior de la concha, el caparazón, está cubierta con grandes estructuras como escamas llamadas escudos. El caparazón está conectado con la parte ventral, llamada plastrón, por medio de placas duras de concha conocidas como puentes laterales (Márquez 1996).

El carapacho o caparazón de la tortuga verde es oval, con margen ocasionalmente festoneado pero no aserrado, no presenta escotadura a la altura de aletas traseras; tiene cuatro pares de escudos costales; longitud recta del carapacho (LRC) hasta 120 cm. La cabeza en su parte anterior es redondeada; con un ancho hasta 15 cm; presenta un par de escamas prefrontales y cuatro pares de escamas postorbitales. En sus extremidades presenta una uña en cada aleta (raras veces dos en algunas crías) (Pritchard y Mortimer 1999). El color del carapacho de los adultos es verde olivo, con vetas radiales de color variable-amarillo, café verde o negro; el color del plastrón varía desde blanco crema hasta amarillo claro (Lagueux 1999). En crías su coloración es negra en el dorso; ventralmente blanca. El nombre de la tortuga verde se debe al color de la grasa ubicada bajo su caparazón, esto es por el tipo de alimentación (Pritchard y Mortimer 1999).

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Sub-Phylum:	Vertebrata
Clase:	Reptilia
Orden:	Testudines
Familia:	Cheloniidae
Género:	<i>Chelonia</i>
Nombre científico:	<i>Chelonia mydas</i> , (Linnaeus, 1758)
Nombres comunes:	Green Turtle (Inglés); Tortuga Blanca, Verde, (Caribe); Aruana, Suruana, Tartaruga, (Brasil); Tortue Verte (Francés); Suppenschildkrote (Alemán).

2.2. Distribución mundial

La tortuga verde se encuentra en las aguas subtropicales y tropicales a lo largo del mundo cerca de costas continentales y alrededor de islas. Su distribución incluye el Caribe de América, de Guayana hasta Florida, costa Oeste de África, Etiopía, Madagascar, Isla Ascensión, Islas Seychelles, Mauritius, Yemen, Ceylan, Tailandia, Indonesia, Borneo, Norte de Australia, Islas Carolinas, Islas Marshall, Hawaii, Galápagos, Costas de México y Centro América en el Pacífico (Hirth 1997).

En Costa Rica esta especie da origen a grandes arribadas principalmente en Barra del Colorado y Tortuguero. En América se encuentra en el océano Atlántico, desde el extremo noreste de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el sur de Brasil. Está limitada geográficamente por las isothermas de 20°C (Márquez 1996).

La principal colonia reproductiva de la especie a nivel global está localizada en la Isla de Raine, en Australia, donde hasta 50.000 tortugas verdes anidan en un año (Limpus *et al.* 2002). En la región del Caribe, la zona de mayor anidación es Playa de Tortuguero, en Costa Rica, entre 17,000-37,000 hembras por año (Troëng y Rankin 2005). En Venezuela anida a bajas densidades a lo largo de toda la costa y con mayor frecuencia en Falcón, Sucre, Nueva Esparta, Archipiélago Los Roques y La Blanquilla (Buitrago *et al.* 2002). Además se sabe que la tortuga Verde en el Atlántico Americano sólo se distribuye en el Golfo de México y Mar Caribe (Johnson 2005).

2.3. Distribución en México

Las anidaciones de la tortuga verde se distribuyen en el Golfo de México y Caribe mexicano en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo; con algunas áreas de mayor abundancia en la Península de Yucatán: Isla Aguada, río Lagartos, Cozumel, etc. (Márquez 1996).

2.4. Ciclo de vida

La tortuga verde, igual que otras tortugas marinas, requiere una amplia variedad de ambientes para desarrollarse, tanto terrestres (playas de anidación) como marinos para su migraciones y alimentación (mar abierto, aguas costeras y estuarinas) (Frazier 2005). Durante el ciclo de vida de las tortugas vedes hay individuos que llegan a atravesar una cuenca oceánica (Lagueux 1999).

Es una especie típicamente nerítica que forma agregaciones en aguas someras, abundantes en pastos y mantos de algas marinas (Balazs 1995). Las poblaciones de tortugas

realizan migraciones desde los sitios de alimentación hasta las zonas de anidación, siguiendo rutas costeras o cruzando zonas profundas. Un ejemplo de derroteros que cruzan grandes extensiones marinas es el de la población que vive en Isla Ascensión, en el Atlántico central, la cual realiza una extensa migración transoceánica (2, 200 Km) hasta llegar al norte de Brasil (Formia *et al.* 2007) y para regresar a la isla tiene que nadar en contra de la Corriente Ecuatorial Sudatlántica (Márquez, 1996).

Las zonas más importantes de anidación para la tortuga verde en la actualidad se encuentran en el Caribe, en el norte de Sudamérica (Brasil, Isla Aves; Venezuela, las islas de Cabo Verde) en el mar Mediterráneo, en las islas del Océano Índico (Malasia, Sarawak, Borneo, norte de Australia) y en las islas del Pacífico central (Hawaii). El periodo de mayor abundancia es entre junio y septiembre. El ciclo reproductivo individual se repite generalmente cada dos o tres años (Márquez 1996).

Los recorridos, que pueden abarcar varios cientos de kilómetros, pasan por diversos países, lo que hace que la tortuga marina sea un recurso internacional, por tal motivo es complicado establecer un reglamento para su conservación ya que ello abarca adicionalmente cuestiones políticas (Lagueux 1999).

Al salir del nido las crías se dirigen al mar abierto para permanecer en ambiente pelágico durante un tiempo. Una vez que las crías se alejan de la playa donde nacieron se pierden hasta que aparecen después de un tiempo en zonas de alimentación (Márquez 1996). En su fase juvenil son carnívoras, lo cual favorece la velocidad de crecimiento y les permite sortear más rápidamente el crítico periodo inicial de mayor depredación. En esta etapa se dirigen hacia aguas oceánicas durante un lapso casi desconocido (Frazier 2005).

El desarrollo sexual les toma entre 15 y 30 años, Y entonces pueden reproducirse durante varias décadas, ya que son longevas. Durante la temporada de anidación llegan a anidar hasta 14 veces, poniendo entre 80 y 150 huevos en cada anidación, sin embargo, no todos los huevos eclosionan ni todas las crías sobreviven; Frazier (2001), menciona que sólo 1 de cada 1,000 crías logra sobrevivir hasta la edad adulta.

2.4.1. Reproducción

Los ciclos de reproducción están regulados por estados fisiológicos y cambios ambientales. En las tortugas marinas los ciclos de reproducción se repiten en periodos anuales, bianuales o tri-anuales; esta frecuencia es de carácter específico para la especie, así, en la lora y la golfina, el ciclo más frecuente es el anual, para carey y caguama generalmente

es bianual y para la verde, la prieta y la laúd puede ser bianual o tri-anual (Limpus *et al.* 1994).

En la granja tortuguera de Gran Caimán, Antillas Mayores, las hembras anidantes de tortuga verde, *Chelonia mydas*, tienen un ciclo de anidación cercano a 1.6 años. Cada hembra produce en promedio de 5 a 7 anidaciones por temporada, con un promedio de 118 huevos por nido disminuyendo en sucesivas anidaciones de la temporada (Hays *et al.* 1999), a intervalos de entre 8-19 días entre cada desove (Bjorndal y Carr 1989). El máximo de huevos producido por una hembra en un periodo anual ha sido de 1,700, los que originaron cerca de 1,400 crías ((Limpus *et al.* 1994).

2.4.2. Anidación

La anidación comúnmente la efectúan durante el verano, en playas arenosas, dentro de zonas tropicales y subtropicales que se encuentran aproximadamente entre los 50°N y 40°S, aunque la mayoría de las playas de anidación se localizan entre los 20°N y 20°S del ecuador (Hirth 1997).

En México (Caribe y Golfo de México) la temporada de anidación de la tortuga verde se da principalmente en los meses entre Junio y Septiembre (Márquez 1996). El ciclo de reproducción se presenta generalmente cada dos o tres años anidando generalmente durante la noche de una a tres veces por temporada con espacios inter-anidatorios alrededor de 14 días, las nidadas contienen aproximadamente 114 huevos y la incubación tarda unos 55 días como promedio (Carr 1975).

2.4.3. Alimentación

Durante la etapa juvenil la mayoría de las tortugas son carnívoras a excepción de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) y la prieta (*Chelonia agassizii*); que después de su primer año de vida inician el cambio hacia la alimentación herbívora (Hendrickson 1980), alimentándose principalmente de algas y pastos marinos (Limpus *et al.* 1994). En los períodos de alimentación se acercan a las costas en busca de aguas someras abundantes en pastizales marinos y mantos de algas, e incluso penetran a bahías y lagunas costeras (Márquez 1996).

2.5. Estado de conservación

En tiempos antiguos, antes de que existiera la refrigeración, las tortugas constituían una de las únicas fuentes de carne fresca para los marineros que visitaban las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Márquez, 1996). Además se exportaban tortugas vivas y productos de estas a Europa, E. U. y Japón con el fin de mantener los mercados de sopa de tortuga

(hecha con la grasa corporal de la tortuga verde) y la concha de carey (Tröeng 2001). El calipee, (material cartilaginoso encontrado dentro del plastrón) también es apreciado para la preparación de sopas (Carr 1952). Por esto, entre otras causas, las poblaciones de *Chelonia mydas*, han sido objeto de una pesca intensiva y como resultado de ello, se están reduciendo o incluso se ha llegado a la desaparición de varias poblaciones en toda su área de distribución. Actualmente es considerada como una especie en peligro de extinción, de acuerdo a los criterios de diferentes organismos nacionales e internacionales de conservación. En la Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies Silvestres en Peligro (CITES) se le tiene catalogada en el Apéndice I, reservado a las especies en mayor peligro.

En la Lista Roja de la UICN (Unión Mundial para la Conservación), la encontramos clasificada como: “EN A2bd” (Seminoff 2004) que corresponde a la categoría de “EN PELIGRO”. También se incluyen en el anexo II del protocolo SPAW de la Convención de Cartagena (1990), en los apéndices I y II de la Convención sobre la conservación de las Especies Migratorias de animales silvestres (CMS, 2006), en los anexos de la Convención del Hemisferio Occidental (Donnelly 1996), clasificación cuya intención es remarcar que su protección es de “Importancia y urgencia especial” (Eckert 1995, en Lagueux 1999), y en la lista de especies en peligro de la Convención Interamericana para la Conservación y Protección de las Tortugas Marinas. En México, se le considera como una especie en peligro de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001.

La alimentación de la tortuga verde adulta, que se basa principalmente en los pastos marinos y en las algas, tiene un importante papel en el ecosistema: el paso del alimento por el tracto digestivo de la tortuga, ayuda a repartir los nutrientes desde áreas ricas (por ejemplo, lechos de pastos marinos) hasta áreas pobres en nutrientes, como las playas (Bouchard y Bjorndal 2000). Inclusive, la energía derivada de las tortugas marinas y sus huevos podrían aumentar las poblaciones de animales y plantas en hábitats terrestres lejos de la playa de anidación, a través de los procesos de depredación y reciclaje de nutrientes (Tröeng 2001).

2.6. Genética de la conservación

La diversidad genética es un mecanismo de seguridad que le permite a una especie lidiar con enfermedades, estrés y condiciones ambientales cambiantes (Encalada 1999). Aun así, la variabilidad a nivel genético se distribuye dentro y entre poblaciones. En el segundo caso, las diferencias entre poblaciones (o estructura) pueden detectarse en las tortugas marinas por medio del ADN mitocondrial (ADNmt) (FitzSimmons *et al.*, 2000). Para análisis a nivel intra-específico los marcadores mitocondriales son los más recomendados, dado que la región

control evoluciona más rápido que el genoma nuclear, y que por la transmisión uniparental del genoma mitocondrial se obtiene una mayor deriva génica (*Ibid*). La herencia maternal también ofrece una ventaja adicional al proporcionar información sobre las conductas reproductoras diferenciales de este sexo que son de importancia para la supervivencia de la especie (Bowen y Avise 1995, en FitzSimmons *et al.* 2000). Aún así, los resultados sobre el flujo génico deben ser tomados con cautela ya que los marcadores biparental indican que aun en casos de aislamiento determinado por el ADNmt, puede existir flujo genético a través de los machos, como es el caso probable para la tortuga verde (Karl *et al.* 1992). No obstante, aun en casos de presencia de flujo mediado por machos, si una colonia reproductora es extirpada, quedando eliminadas las hembras que son las más fieles al sitio de reproducción, los machos de otras colonias no serían capaces de reponer la población perdida..Por esto, los resultados a partir del análisis del ADNmt siguen siendo los más informativos y útiles para el manejo al poder identificar las poblaciones reproductoras (stocks, o “unidades de manejo”). Con esta información se puede también correlacionar unidades de manejo con datos del nivel de peligro de extinción en que se encuentra cada una de ellas (Moritz 1994). FitzSimmons *et al.* (1997) mencionan que el conocimiento de las diferencias genéticas entre las poblaciones anidadoras hace posible determinar qué colonias reproductoras contribuyen a un área particular de alimentación o de captura.

Los estudios genéticos moleculares han sido innovados por la tecnología de la PCR que permite la amplificación de genes específicos a partir de pequeñas cantidades de ADN. Los métodos basados en la PCR requieren cebadores específicos, segmentos cortos de ADN sintético, que dirigen la reacción mediada por la enzima. En la actualidad se cuenta con varios cebadores que permiten replicar sobre el ADN nuclear y mitocondrial de todas las especies de tortugas marinas.

3. ANTECEDENTES DE TRABAJOS MOLECULARES EN TORTUGA VERDE

Las técnicas genéticas han sido aplicadas ampliamente en la tortuga verde, para detectar “marcadores moleculares” que permitan delimitar unidades poblacionales, reconocer su grado de endogamia, su estructuración genética y dinámica metapoblacional (Bowen y Karl 1997). Los estudios genéticos más útiles para el manejo de las tortugas han sido los que permiten detectar linajes maternos, como la región control (RC) del ADN mitocondrial (ADNmt) y se han realizados en las diversas regiones del Atlántico donde se distribuye la tortuga verde (Bowen *et al.* 1992; Allard *et al.* 1994; Encalada *et al.* 1996, en Lahanas *et al.* 1998).

Los estudios de Encalada *et al.* (1996) sobre las poblaciones de la tortuga verde a ambos lados de la cuenca Atlántica son referencia obligada para estudios sobre la estructura de sus poblaciones. Están basados en 147 muestras de nueve poblaciones, ocho correspondientes al Atlántico y una colonia en el Mediterráneo (Chipre), de las cuales identificaron 18 haplotipos, de los cuales siete se encontraron en Quintana Roo (denominado por ellos simplemente “México”), en únicamente 20 muestras de X’Cacel y Cozumel. Determinaron los índices de diversidad genética: diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π), ubicando a esta población con los valores más altos en ambos parámetros ($h=0.82$ y $\pi=0.0057$) con respecto al resto de las colonias del Atlántico. Identificaron dos grandes linajes: Caribe occidental-Mediterráneo y Caribe oriental-Atlántico Sud-África occidental. La información ha servido como base para determinar las contribuciones de las poblaciones en la región a los diferentes sitios de alimentación. Luke *et al.* (2004) y Lahanas *et al.* (1998) han realizado estudios de áreas de alimentación para poblaciones juveniles de la tortuga verde en aguas de Barbados y Bahamas Allard *et al.* (1994); Encalada *et al.* (1996) y Lahanas *et al.* (1998) usando marcadores genéticos encontraron que las tortugas verdes provienen de varias colonias de anidación del Atlántico y Mediterráneo previamente descritas y que cada colonia contribuye en diferente proporción a las distintas áreas de alimentación. Según Lahanas *et al.* (1998) dicha proporción está influida por el tamaño de las colonias y por la cercanía que existe entre la colonia y el sitio de alimentación. Por ejemplo, en las Bahamas (Great Inagua) encontraron que la mayoría de los juveniles provienen de la región occidental del Caribe, en proporciones comparables a los tamaños de las colonias origen. Los autores concluyeron, además, que los resultados apoyan un modelo de ciclo de vida en el que los individuos se ven mezclados en sus fases pelágicas y bénticas, arrastradas por las corrientes oceánicas que los arrastran entre sitios de alimentación. Como consecuencia de esta convergencia, las amenazas sobre tortugas en sus zonas de alimentación impactarían las poblaciones anidadoras en una amplia escala geográfica. En el trabajo realizado en las costas de Barbados por Luke *et al.* (2004), plantean

que la composición en los agregados depende del tamaño de la colonia, la distancia que existe entre la colonia y los agregados y añaden otro punto: la influencia de las corrientes oceanográficas: aquí se identificó una contribución significativa de México (10.3%). Los autores concluyen que las corrientes oceanográficas son la principal explicación de la composición en Barbados y que, debido a su estratégica situación geográfica ubicada en la confluencia de varios sistemas de corrientes oceánicas se encontró una de las mayores diversidades de stocks, con orígenes ubicados tanto en el Caribe como fuera de él (Caribe: Florida, Costa Rica, Isla Aves y México: Atlántico: Surinam, Brasil, Ascensión, Guinea Bissau y Chipre), aunque la principal aportación procede de las colonias ubicadas hacia el sur del Atlántico (Aves-Surinam e Isla Ascensión).

Otro de los estudios realizados sobre los sitios de alimentación, fue efectuado en aguas de la Isla Hutchinson, en el este de la costa central de Florida y realizado por Bass y Witzell en el 2000. Al analizar el ADNmt en 62 muestras encontraron contribuciones de diversas colonias a este agregado, determinando que Costa Rica contribuye con un 53%, Estados Unidos junto con México contribuyen con 42% y un 4% proviene de Islas Aves y Surinam. Los autores mencionan que estos resultados contrastan significativamente con los reportados en las Bahamas (Lahanas *et al.* 1998), donde por ejemplo sólo la colonia de Costa Rica aporta un 80% a las Bahamas. Entre las conclusiones destaca que el principal factor que determina la estructura a este sitio de alimentación es la distancia que hay entre las colonias de anidación y los sitios de alimentación.

Carreras *et al.* (2006) analizaron muestras provenientes de ocho sitios de alimentación en la región del Mar Mediterráneo y en las aguas contiguas del Océano Atlántico, para conocer la estructura genética de la tortuga *Caretta caretta* analizando su ADNmt. Encontraron que había una gran diferenciación genética en las poblaciones de la región oeste del Mediterráneo explicada por los patrones de corrientes superficiales y masas de agua, sugiriendo que las tortugas juveniles de dicha especie entran en el Mediterráneo occidental desde el Atlántico y hay una conexión con el este del Mediterráneo debido a las masas de agua, con un flujo limitado de tortugas entre estas dos masas de agua.

En otro estudio, Moritz *et al.* (2002) identificaron varios stocks de la tortuga verde en Australasia, compuestos la mayoría por colonias aisladas, mientras que otros, por grupos de colonias genéticamente interconectadas y separadas por distancias menores a 100 kilómetros. Otra aplicación de relevancia para el manejo y conservación en el Indo-Pacífico, fue el esclarecimiento del origen de las tortugas en sitios de alimentación con diferentes niveles de impacto antropogénico (principalmente pesquerías) usando los perfiles haplotípicos de los

stocks. Moritz *et al.* (2002) concluyeron que diferentes pesquerías impactan múltiples stocks y la magnitud del impacto varía entre pesquerías. En algunos sitios de alimentación, la contribución de unas pero no todas las colonias cercanas son mayoritarias, mientras que la contribución de colonias distantes es poco común.

Para ampliar el conocimiento de la dinámica y patrones reproductivos de la especie es necesario complementar resultados del ADNmt con estudios de marcadores nucleares, especialmente microsatélites que, por sus altísimas tasas de mutación, permiten el análisis de la diferenciación interpoblacional a escala fina. Por ser heredados de manera bi-parental pueden ser contrastados con resultados del ADNmt, para distinguir diferencias entre sexos en los patrones y tasas de flujo génico entre poblaciones como se ha hecho para la tortuga verde de Australia (FitzSimmons *et al.* 1997). Estos autores analizaron y compararon dos marcadores nucleares y el ADNmt, y confirmaron la mayor capacidad resolutive de los microsatélites. Sin embargo, el nivel de diferenciación genética entre poblaciones es mucho mayor utilizando la genealogía materna que la herencia bi-parental, por esta misma condición el nivel de flujo génico fue más alto con los marcadores nucleares que con los mitocondriales.

Entre las colonias de anidación de *Chelonia mydas* más grandes del Gran Caribe se encuentra la de Tortuguero localizada en Costa Rica, en la cual Bjorndal *et al.* (2005) realizaron estudios de la RC del ADNmt. Debido que en 1996, Encalada *et al.* obtuvieron una muestra muy pequeña (n=15), Bjorndal y colaboradores con la finalidad de no tener restricciones en cuanto al tamaño muestral, decidieron tomar una muestra de 392 individuos. Entre éstos se detectaron cinco haplotipos, es decir, apenas tres haplotipos nuevos para la colonia de Tortuguero. Los análisis moleculares de la diversidad haplotípica ($h=0.16$) y nucleotídica ($\pi=0.0034$), mostraron valores bajos en comparación con los de otras colonias más pequeñas en el Gran Caribe (México <<Quintana Roo>> n=20, Florida n=24, Aves n=30 y Surinam n=15). Por otro lado calcularon que los haplotipos encontrados en Tortuguero, representan un 36% del total encontrado en el Gran Caribe pero contribuyen con un 17% a los sitios de alimentación en esta misma área. Mencionan que es necesario tener un adecuado manejo tanto de colonias grandes, como la de Tortuguero, como en colonias pequeñas, para que se pueda conservar la diversidad genética.

En un estudio realizado por Bass *et al.* (2006) se hizo una recopilación de los resultados de los estudios de diferentes colonias de anidación del Caribe y Atlántico, y se analizó su contribución al sitio de alimentación ubicado en Carolina del Norte. Encontraron que la colonia de anidación de la costa de Florida dominó, aportando un 54 %, México presentó un 27%, Costa Rica con un 12%; y el resto (7%) lo presentaron las colonias del Sureste del

Atlántico. Los haplotipos con mayor abundancia corresponden a CM-A1 y CM-A3 que ya estaban identificados (Encalada *et al.* 1996 y Lahanas *et al.* 1998). También encontraron cuatro nuevos haplotipos, de los que hasta ese momento se desconocía el origen. Se compararon los niveles de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) con los valores de publicaciones previas 0.7294 ± 0.0301 y 0.00053 ± 0.0031 respectivamente, valores que denotan una alta diferenciación genética probablemente debido a que Carolina de Norte se localiza entre las corrientes de Florida, la del Golfo y la de las Antillas.

Bjorndal *et al.* en el 2006, realizaron un estudio de secuencias de ADNmt de tortuga verde en las costas de Brasil, analizando tres playas de anidación (Isla Trindade, Atolón de Rocas y Fernando de Noroña) y dos sitios de alimentación (Atolón de Rocas y Fernando de Noroña) con la finalidad de conocer el grado de diferenciación genética y estimar la contribución de las poblaciones de anidación a los sitios de alimentación. Con una muestra de 200 individuos, encontraron 13 haplotipos, uno de los cuales lo reportaron como nuevo. Los resultados de diferenciación indican que entre Atolón de Rocas y Fernando de Noroña, las colonias más pequeñas (115 y 10 hembras anidantes, respectivamente) y más cercanas (alejadas entre sí por 155 km), no hay diferencias significativas, en cambio si las hay entre Trindade y las colonias anteriores (alejadas por 1,850 km). Con estos resultados Bjorndal *et al.* (2006) concluyeron que en distancias menores a 155 km, las colonias no presentan una diferenciación significativa.

En el Atlántico oriental, Formia y colaboradores (2006) analizaron la estructura genética de poblaciones de África abarcando seis sitios en el oeste de África ($n=178$) y uno en el Océano Índico ($n=10$) encontrando 14 haplotipos, 10 de los cuales no habían sido descritos, 7 de los cuales se encontraron en la costa oeste de África. El haplotipo CM-A8 fue el más común para esta zona (83.5%) presentándose en las seis poblaciones. En la colonia Comoros en el Océano Índico, los tres haplotipos encontrados fueron nuevos. La diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π), fueron bajas en las colonias del oeste de África y alta en Comoros en el Océano Índico, 40 veces mayor que en las colonias de África. Con el programa TCS v. 1.2.1 (Clement *et al.* 2000) realizaron una evaluación de las interconexiones entre los haplotipos, ubicando al CM-A8 como el ancestral, y los demás se diferenciaron de éste por una sustitución excepto cuatro haplotipos el CM-A38 y los del Índico (IND1, IND2 e IND3) que difieren por 4 y 31 sustituciones respectivamente. Con un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) determinaron 1) la diferenciación entre las cuencas oceánicas, 2) la distribución de la variación entre y dentro de las colonias que están dentro del Atlántico.

En ese mismo año, Dethmers *et al.* trabajando con *Chelonia mydas* efectuaron uno de los estudios más completos realizados. Estos autores recurrieron a las técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa PCR y secuenciación, y utilizaron datos disponibles de capturas anteriores de *Chelonia mydas* para tener una perspectiva más completa para, apoyar con bases científicas el manejo de esta especie en los ámbitos nacional e internacional. Incluyeron una amplia área de estudio en la región de Australasia, comprendiendo 27 colonias de anidación con 714 individuos hembras analizadas. Identificaron un total de 25 haplotipos amplificando un segmento de 384 pb de la región control del ADNmt. Identificaron 17 Unidades de Manejo (UM) algunas de las cuales están formadas por más de una población y que, en general, están separadas entre sí por más de 500 km. El resto de los análisis los realizaron con relación a las unidades de manejo. En el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) aplicaron dos métodos para la estimación de la varianza inter-poblacional: distancias genéticas y frecuencias haplotípicas, y determinaron que la distribución de la variación es más fuerte usando distancias genéticas, sugiriendo que se trataba de poblaciones que pertenecen a distintos linajes. Con la Prueba de Mantel encontraron evidencia de que la diferenciación sigue un modelo de aislamiento por distancia a partir de los 2000 km. Al comparar con información de los programas de marca/recaptura realizados con hembras anidadoras encontraron que, efectivamente, había evidencia de migraciones que coincidían con las unidades de manejo que resultaron del análisis genético. Esto lo explican argumentando que los cambios del nivel del mar han sido propiciados por numerosos eventos de glaciación, y como resultado algunas playas han desaparecido, por lo que las hembras se ven forzadas a buscar nuevas playas para anidar, situación que se ve reflejada en la composición genética similar de colonias físicamente distantes.

Tratando de tener una mejor perspectiva del comportamiento de la Tortuga verde Formia y colaboradores en el 2007 realizaron un estudio exhaustivo en la colonia de anidación más importante del Atlántico sur: Isla Ascensión. Analizaron la región control del ADNmt en 245 muestras, de 10 playas de anidación de esta isla. Al incluir también 50 muestras que habían procesado con anterioridad (2006), se encontraron variaciones dentro de la misma población a lo largo del tiempo y con otras poblaciones que anidan en el Atlántico. Encontraron 13 haplotipos de los cuales únicamente tres se habían observado en colonias de anidación de isla Ascensión, otros cinco haplotipos que fueron reportados como nuevos, los cinco restantes habían sido observados en distintas playas de anidación. El haplotipo más común fue el CM-A8 con un 83%, mientras que los otros presentan una frecuencia muy baja (1 ó 2 individuos). Para evaluar las relaciones evolutivas entre los haplotipos que se han

encontrado en el Atlántico realizaron un análisis TCS el cual se basa en una estadística parsimoniosa. Este análisis reveló que todos los haplotipos se distinguen del CM-A8 por una sustitución, a excepción del CM-A39 que se diferencia por dos sustituciones. En cuanto a la estructura poblacional evaluados por el estadístico F_{ST} se compararon los datos para Ascensión de Encalada *et al.* (1996) $n=20$, con los de Formia *et al.* (2006, $n=50$ y 2007, $n=195$) las cuales presentaron una diferenciación significativa, mientras que entre las últimas dos temporadas no se observaron diferencias a una $P < 0.001$. Realizaron comparaciones entre las colonias del Atlántico comparando con datos de Encalada *et al.* (1996), dando como resultado que Ascensión no era significativamente diferente a Isla Bioko y Santo Tomas (colonias de África), a diferencia de los resultados obtenidos por Formia *et al.* (2006, 2007) contra los mismos datos del resto de las colonias del Atlántico, en los que el nivel de diferenciación resulta altamente significativo. Ante la duda de que el tamaño de muestra fuera el adecuado para observar la totalidad de los haplotipos en Isla Ascensión, estos autores decidieron realizar un análisis de rarefacción; calcularon que pueden encontrarse un máximo de 18 haplotipos. Realizando una extrapolación, el 72% (13 haplotipos) de la diversidad de haplotipos puede ser explicada con el tamaño de muestra que se tiene (224), y para obtener un 94% (17 haplotipos) se requerirían aproximadamente 1,384 muestras. Para Tortuguero en Costa Rica, tomaron datos de Bjorndal *et al.* (2005) y realizaron el análisis de rarefacción y calcularon que se pueden llegar a observar un máximo de seis haplotipos. Con el tamaño de muestra actual (433) se han observado 5 haplotipos que describen el 83% de la variación total y para encontrar los 6 haplotipos se requerirían 729 individuos. Ellos recomiendan utilizar la rarefacción para conocer el tamaño de muestra conveniente que describa la diversidad total de haplotipos en las playas estudiadas.

Como pasa con otros vertebrados marinos, la distribución de los haplotipos de la región control del ADNmt en *Chelonia mydas* en el Atlántico tiende a caracterizarse por pocos haplotipos comunes y numerosos raros (Lahanas *et al.* 1994, Encalada *et al.* 1996, Formia *et al.* 2006).

Naro-Maciel *et al.* (2007) realizaron uno de los estudios más completos para *Chelonia mydas* en la región del Atlántico. Uno de sus objetivos era el conocer los hábitos migratorios, calcular la diferenciación genética y aclarar el origen de las tortugas en las poblaciones estudiadas, para lo cual incorporaron a su estudio una recopilación reciente de datos de las colonias de anidación y sitios de alimentación ya estudiados y publicados. Ellos hacen un estudio en dos sitios de alimentación: Ubatuba y Almofala ubicados en la costa de Brasil, tratando de explicar como el tamaño de población, distancia geográfica, sitio natal y las

corrientes oceánicas afectan la dispersión. Para realizar estos análisis utilizaron la región control del ADNmt y siete loci de microsatélites, esto con la finalidad de conocer la contribución de hembras y machos. En Ubatuba se definieron 10 haplotipos, uno de los cuales no había sido reportado. De nuevo en esta región se observó una dominancia del haplotipo CM-A8 con un 73%, y uno de los haplotipos (CM-A44) no se ha encontrado en colonias de anidación. En Almofala se definieron 13 haplotipos que ya estaban reportados. Al igual que en Ubatuba el haplotipo más común fue el CM-A8 con un 45% y de igual manera se observó el CM-A44. En cuanto a los análisis de diferenciación genética, el uso del ADNmt puso en evidencia una mayor diferenciación que la detectada con análisis microsatelitales, probablemente debido a que con loci nucleares se detecta mayor flujo génico, ya que en éstos participan hembras y machos (Karl *et al.*, 1992; FitzSimmons *et al.* 1997, Moritz *et al.* 1997; Roberts *et al.* 2004). En base a los Análisis de Stocks Mezclados, se rechazaron las hipótesis sobre su origen, descartando que la distancia geográfica y el tamaño de las poblaciones de anidación fueran factores determinantes.

En el 2007, Bowen y Karl realizaron una revisión de los trabajos sobre tortugas marinas en las temáticas de comportamiento, biogeografía y factores ecológicos que determinan la distribución de la diversidad genética en las siete especies de tortugas marinas. Observaron que había una fuerte estructura entre las colonias de anidación a partir de los análisis con ADNmt, mientras que los loci nucleares revelan un patrón de flujo génico mediado por los machos. Los análisis de stocks mezclados que se han realizado confirman que múltiples colonias de anidación contribuyen a sitios de alimentación, de tal manera que la explotación de tortugas marinas en estos hábitats pueden reducir las poblaciones reproductoras en grandes regiones. Otro análisis que se ha realizado ha sido las pruebas de paternidad múltiple con ADN nuclear, obteniendo que se presenta desde un 0 hasta 100% en las especies de tortugas marinas. Bowen y Karl (2007) mencionan que hay una separación de las tortugas entre las cuencas oceánicas que esta mediada por giros de agua cálida que ocasionalmente atraviesan la zona de surgencia en el sur de África. Estos raros eventos pueden ser suficientes para evitar la especiación alopátrica.

En conclusión general, se confirma la robustez del uso del ADNmt para la identificación de poblaciones. Tiene la gran ventaja que, al ser heredado exclusivamente por vía materna, mantiene un tamaño efectivo de población una cuarta parte la de los genes nucleares, lo que genera mayores tasas de diferenciación local por deriva génica y, por tanto, mayor sensibilidad a los procesos demográficos de relevancia para el manejo.

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos 10 años se ha observado una tendencia al incremento de anidaciones de la tortuga verde en el Atlántico mexicano (Garduño *et al.* 2001) y también en todo el Atlántico occidental (Seminoff 2002). En México, estos datos alentadores son resultado de políticas de protección (particularmente en playas), que incluyen a los programas nacionales y estatales de conservación. También, la veda total a la captura de tortugas marinas (Diario Oficial de la Federación, 1990) y en el ámbito regional, la implementación de tratados internacionales como la CITES y las acciones de cada país han contribuido a la recuperación de las poblaciones. Sin embargo, aún persisten amenazas como la pesca incidental, captura legal en algunos países y la pérdida o transformación de hábitat de manera discontinua a lo largo de su vasta área de distribución. En México, por ejemplo, los desarrollos turísticos son la principal amenaza a los hábitats de reproducción de la tortuga verde en playas del Caribe.

No obstante, el incremento de las anidaciones esconde un grave desconocimiento y falta de capacidad para proteger a la tortuga verde a lo largo de su ciclo vital. Solamente cuando se tenga este conocimiento y se pueda asegurar la protección en sus diferentes fases, o mitigar las amenazas a que está sujeta, entonces se podrá considerar fuera de peligro. Para esto es necesario primero conocer la identidad de las poblaciones (o stocks) del Caribe mexicano y sus rutas migratorias. Se conoce que existen varias playas de anidación de la tortuga verde en las costas de Quintana Roo. La poca información disponible se basa en recapturas de marcas colocadas en hembras reproductoras y su seguimiento por rastreo satelital. Los resultados de las recapturas en Cuba de tortugas verdes marcadas en la región (Moncada *et al.* 2006), sugieren un comportamiento migratorio distinto para las colonias de Quintana Roo (que han sido recapturadas en sitios de alimentación en Cuba) o que las de Campeche y Yucatán (que permanecen ausentes). Los únicos resultados genéticos acerca del reclutamiento de tortugas verdes nacidas en colonias mexicanas a sitios de alimentación en diversas áreas del Atlántico y bajo diferentes niveles y características de amenazas (Bahamas- Lahanas *et al.* 1998; Florida - Bass y Witzell 2000; Nicaragua- Bass *et al.* 1998; Barbados- Luke *et al.* 2004), se basan en información provenientes de pocas colonias en Quintana Roo (Encalada *et al.* 1996), derivados de un muestreo pequeño (total N=20) que no representa la extensión completa de la distribución geográfica de esta tortuga en el Caribe mexicano.

Los datos genéticos en conjunto con la información de recaptura de marcas pueden actuar sinérgicamente. Por un lado los estudios de marcado generan hipótesis acerca de patrones de migración que son probadas con los datos genéticos, también los datos de marcaje pueden usarse para probar si las poblaciones anidadoras que parecen estar unidas por flujo de

genes también muestren un intercambio frecuente de anidadoras dentro de una escala temporal contemporánea. Los datos moleculares pueden proporcionar nuevas perspectivas que pueden probarse subsecuentemente a través de los programas de marcado y finalmente los datos genéticos pueden demostrar eventos raros de colonización desde una gran distancia, que serían difíciles de documentar con estudios de marcaje exclusivamente (FitzSimmons 2000).

El grado de diferenciación genética de las colonias mexicanas con respecto a las de la región, junto con las estimaciones del nivel de contribución de las colonias mexicanas a diversos sitios de alimentación, servirá para modular las políticas de manejo que más se apeguen a la condición de las poblaciones mexicanas y las amenazas que enfrentan en sitios de mezcla de stocks en aguas de otros países o internacionales.

Por ello, este estudio constituye la primera investigación con esta cobertura geográfica en colonias de tortuga verde en el Caribe mexicano. El análisis genético (secuencias del ADNmt), permite caracterizar genéticamente una muestra verdaderamente representativa de las colonias y de allí dar seguimiento a sus patrones migratorios a través de la evaluación de la proporción de colonias anidadoras en el Caribe mexicano que están presentes en sitios de alimentación de la región.

Con esto fue posible responder grandes preguntas: cuántos stocks de tortuga verde existen en el Caribe mexicano cuál es la extensión geográfica de esta/s? De gran importancia para las estrategias de manejo con visión regional congruente con la naturaleza migratoria de la especie, también se adquiere conocimiento sobre la contribución de las poblaciones de Quintana Roo a los hábitats de alimentación en la región. Este conocimiento servirá de apoyo para evaluar la distribución geográfica (a nivel nacional e internacional) de los stocks individuales que son estudiados en este trabajo y conociendo las amenazas que existen para esta especie en la región, ajustar las estrategias y políticas de conservación.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la estructura genética de las poblaciones de tortuga verde, *Chelonia mydas*, en el Caribe mexicano por medio del análisis de la región control del ADNmt.

5.2. Objetivos específicos

- a. Determinar la distribución geográfica de la variación nucleotídica en la región control del ADNmt entre las principales colonias anidadoras.
- b. Comparar niveles de diversidad genética en y entre las colonias estudiadas y con respecto a los valores reportados para otras colonias de la especie en otras regiones.
- c. Determinar niveles de flujo génico entre colonias.
- d. Usar los perfiles haplotípicos de este estudio para estimar la contribución de colonias mexicanas a hábitats de alimentación y desarrollo en el Atlántico de los que se conoce la composición a través de marcadores mitocondriales.

6. AREA DE ESTUDIO

El muestreo de tejido para el presente trabajo se llevó a cabo en las ocho principales playas de anidación (ANEXO V), abarcando el ámbito completo de los sitios de reproducción de *Chelonia mydas* en el Caribe mexicano, comprendiendo desde el sitio más al norte (Holbox), las más abundantes en la zona central del estado (Chemuyil-Cahpechen) y la Isla de Cozumel. Este muestreo representa una amplia extensión geográfica de aprox. 250 km en Quintana Roo (Figura 6.1; Tabla 6.1)

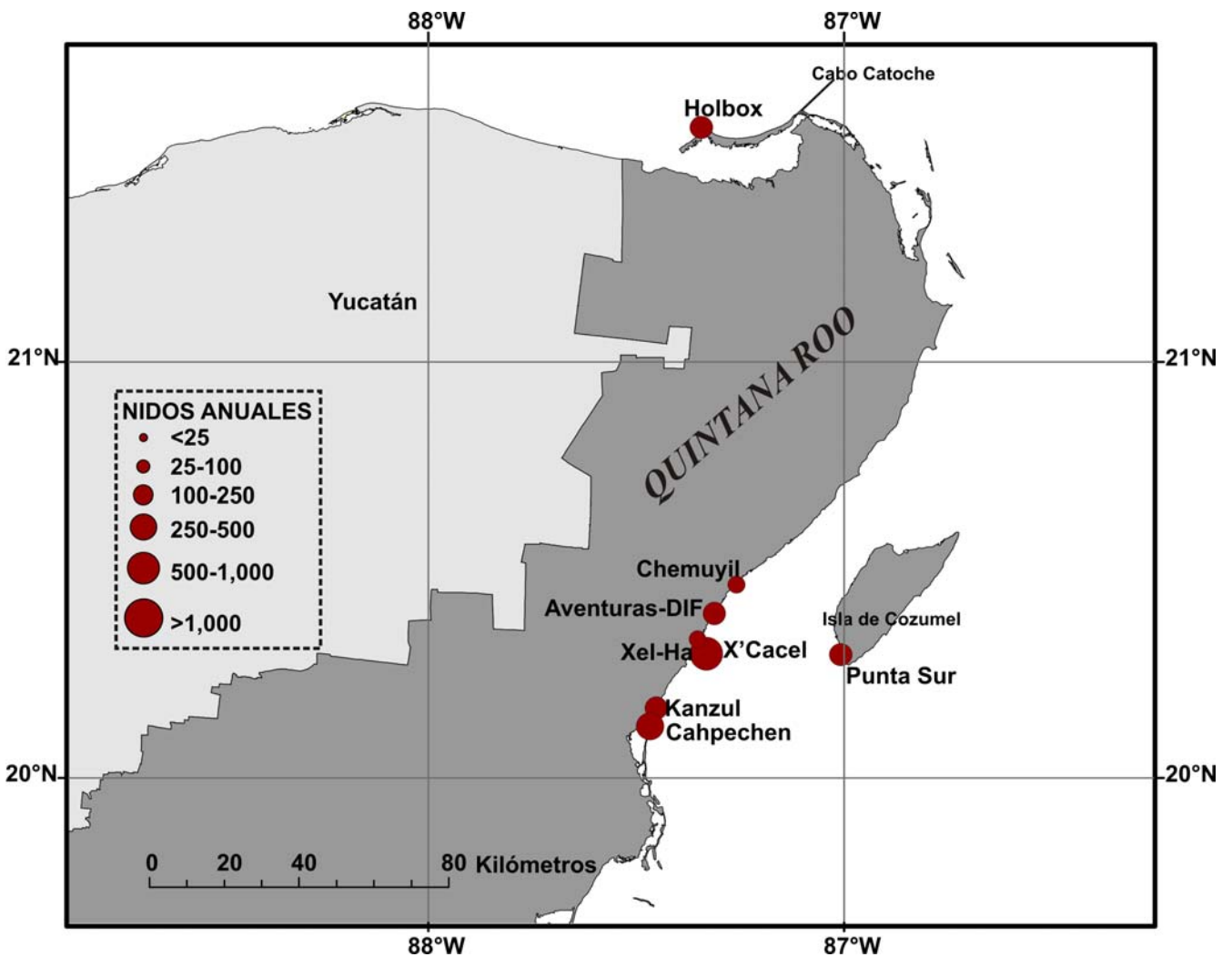


Figura 6.1 Localización de los sitios de muestreo con una indicación del tamaño de las colonias analizadas en términos del número de nidos anuales.

Tabla 6.1 Ubicación geográfica de las playas de anidación muestreadas. *Área Natural Protegida

Sitios	Estado	Nombre de playa de anidación de tortuga verde	Ubicación
1	Quintana Roo	Isla Holbox	21° 34' 50" N - 87° 21' 33" W
2		Isla de Cozumel-Pta Sur	20° 18' 42" N - 87° 00' 26" W
3		Aventuras DIF	20° 22' 5" N - 87° 20' 57" W
4		X'cacel*	20° 20' 27" N - 87° 21' 37" W
5		Xel-Há	20° 19' 8" N - 87° 21' 37" W
6		Kanzul-Ojo de Agua	20° 10' 1" N - 87° 27' 4" W
7		Larios-Cahpechen	20° 7' 21" N - 87° 27' 4" W
8		Chemuyil	20° 21' 6" N - 87° 28' 59" W

7. METODOLOGIA

7.1. Obtención y preservación de muestras

Se obtuvieron muestras de tejidos extraídos de neonatos que no sobrevivieron por causas naturales en sus primeros días después de nacer o por biopsia superficial utilizando una pequeña punción en aletas traseras de hembras anidantes, método demostrado que no las daña (Dutton, 1996). Se seleccionaron nidos puestos dentro de un período de 14 días para evitar recolectar productos de mismas madres. Los tejidos recolectados fueron preservados en solución de NaCl saturada, conteniendo DMSO (dimetil sulfóxido) y EDTA a un pH de 7.5 (Amos y Hoelzel 1991. Protocolos 1 y 2 ANEXO 1) para después congelarlos para su posterior análisis o almacenamiento permanente en la *Colección de tejidos y ADN* del laboratorio de Genética de la Unidad Académica Mazatlán del ICML de la UNAM.

7.1.1. Temporada 2005

De los sitios de muestreo que cubren la distribución total de las anidaciones de la especie *Chelonia mydas* en el Caribe mexicano, el primer año (2005) se tomaron 34 muestras de varias playas de anidación (Tabla 7.1). Originalmente se iba a muestrear la playa de X'cacel por ser una playa índice con seguimiento poblacional consistente, pero debido a los daños producidos por dos huracanes que se presentaron en la temporada de anidación (Emily en el mes de julio con categoría 4 y Wilma en el mes de octubre con categoría 5) que provocaron daños e interfirieron con la obtención de muestras en todas las playas, por lo que sólo se obtuvieron muestras de las playas y nidos que se pudieron encontrar (Tabla 7.1).

7.1.2. Temporada 2006

En el segundo año (2006) se recolectaron 201 muestras que permitirían además del estudio de estructura genética el poder evaluar posibles fluctuaciones entre dos temporadas de anidación (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Muestras recibidas en las dos temporadas de anidación (2005 y 2006).

Estado	Playa de anidación	# muestras 2005	# muestras 2006	Colaborador
Quintana Roo	Isla Holbox		16	Eduardo Cuevas / Pronatura Península de Yucatán, A.C.
	Isla de Cozumel- Pta Sur		28	Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
	Aventuras DIF	1		Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
	X'cacel*	16	47	Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
	Xel-Há	2	10	Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
	Kanzul- Ojo de Agua	10	63	Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
	Larios- Cahpechen	4	27	Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
	Chemuyil		10	Alejandro Arenas / Flora, Fauna y Cultura A.C.
*playas índice	TOTALES	33	201	

7.2. Extracción y valoración del ADN

El ADN fue aislado de las muestras por medio de precipitación con LiCl. (Aijanabi y Martínez 1997; ANEXO 2). Para verificar la presencia e integridad de ADN, se corrió en geles de 7 x 8.5 cm de agarosa al 1% en electroforesis durante 1.5 horas a 49 Volts. Una vez aislado se midió la concentración del ADN por medio de densitometría sobre fotografías digitales de los geles y midiendo la intensidad de fluorescencia en los electromorfos teñidos con bromuro de etidio (EtBr) (0.5µg/ml) durante 30 min y transiluminados con UV (Norgen 2004. ANEXO 3). Para su conversión a ng se compararon los resultados de las bandas de ADN de las muestras contra las bandas en el mismo gel de un estándar de tamaño y masa (HyperLadder IV, BIOLINE, No. de catalogo: BIO-33030). La medición se basa en la densitometría usando el programa Scion Image (Scion Corporation) para transformar medidas de intensidad (en pixeles) a nanogramos (ng), con referencia a los valores de las bandas del estándar. Los datos que se obtienen son llevados a una plantilla en Excel diseñada en el Laboratorio de Genética, la que nos proporciona la cantidad de ng de cada banda, por medio de una regresión de la relación pixeles-ng ADN del estándar. Para amplificaciones por PCR se ajustaron las concentraciones para usar de 20-50 ng por reacción de 25µl.

7.3. Amplificación de la región control.

Una vez obtenido el ADN se procedió a amplificar la región control del ADNmt por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados en el laboratorio de Genética de la Unidad Académica Mazatlán del ICML de la UNAM. En la temporada de anidación del 2005 se utilizaron los oligonucleótidos LTEi9agc/H950g (Abreu-Grobois, en prep.) que permiten, con un producto de aproximadamente 890 pb, de mayor resolución que los productos obtenidos usando otros oligonucleótidos disponibles para las tortugas marinas. En la temporada de anidación del 2006, debido a que se tuvieron problemas con el protocolo que ya se tenía estandarizado con los anteriores oligonucleótidos, se utilizó un par nuevo LCM15382/H950g, (Abreu-Grobois, en prep.) (Tabla 7.2) con los que se obtuvo un producto ligeramente más grande de aproximadamente 920 pb, que se alinea aproximadamente 30 pb antes que el oligonucleótido anterior (LTEi9agc) (Fig. 7.1). Además se obtuvo una mejor calidad de secuenciación, reflejándose en la rapidez con que se verificaron y corrigieron las secuencias debido a que presentaban pocos errores.

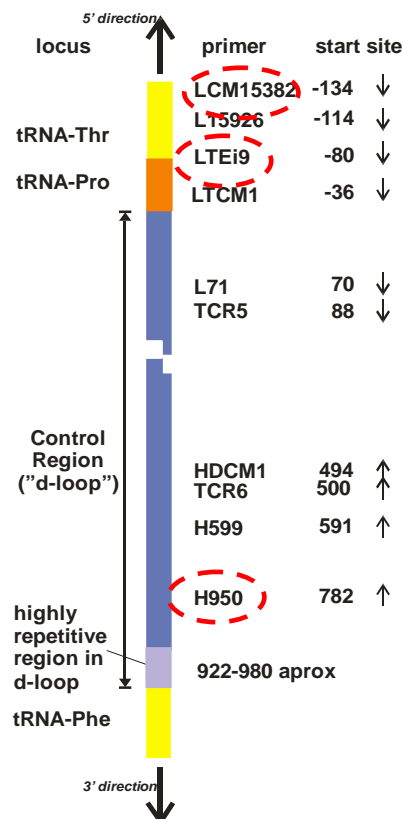


Figura 7.1. Ubicación de los oligonucleótidos de secuenciación utilizados en este trabajo (Abreu-Grobois *et al.* 2006)

Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo:

Temperatura de alineación: 95°C (4 minutos), seguido por 30 ciclos de 95°C (30 seg); 52°C (30 seg); 72°C (30 seg, con un incremento de 5 seg cada ciclo), finalizando con 72°C (7 minutos). Se utilizaron volúmenes de 25 ó 50 µl según la necesidad de completar la cantidad deseada para su secuenciación, las concentraciones finales fueron: MgCl₂ 2.5 mM, oligonucleótidos 0.5 µM, dNTPs 0.2 mM, 20-50 ng de template ADN, una unidad/25 µl de Taq polimerasa (BIOLASE DNA Polimerase, de BIOLINE), todo esto en Buffer 1X (conc. original del buffer 10 X: TRIS-HCl 1M, pH 8.8 conc. 100mM, KCl 2.5 conc. 500mM, MgCl₂ 1M conc. 15mM, TRITON X-100 1%, agua estéril).

Tabla 7.2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Tm	Secuencia
LTEi9agc	54.7°C	5'-AGC GAA TAA TCA AAA GAG AAG G -3'
LCM15382 (nvo.)	55.3°C	5'-GCT TAA CCC TAA AGC ATT GG-3'
H950g	57.3°C	5'-GTC TCG GAT TTA GGG GTT TG -3'

Se verificaron los productos de PCR, comparando su tamaño contra los estándares (HyperLadder IV, Bioline; No. catalogo: BIO-33030) de tamaño y peso molecular conocido (Fig. 7.2). Este resultado confirmó que nuestros productos corresponden a un fragmento de la región control de aproximadamente 900 pb, como se había esperado.

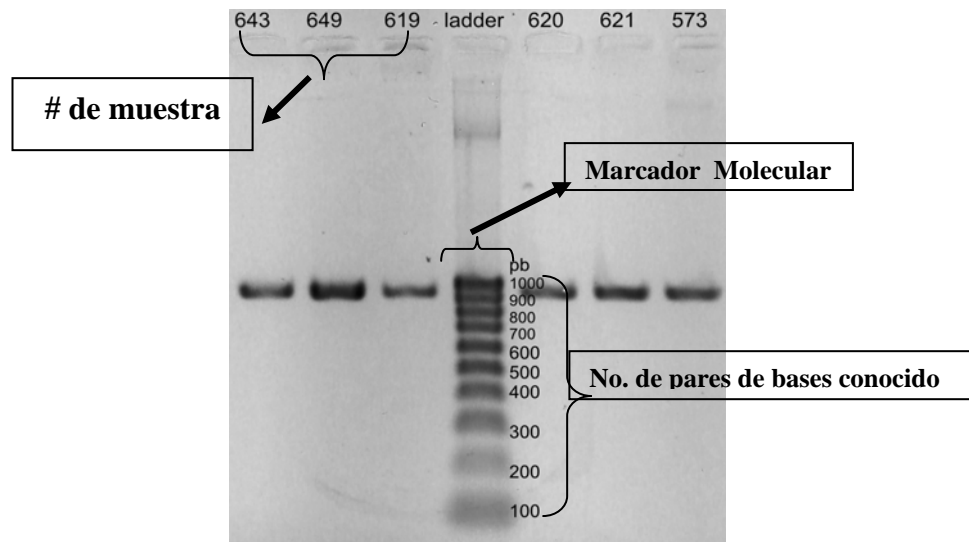


Figura 7.2. Productos de PCR con los oligonucleótidos LCM15382/H950g, (aprox. 900 pb)

7.4. Purificación y secuenciación

Los productos de la amplificación de la región control fueron purificados con filtros QIAGEN MinElute (ANEXO IV) agregando el volumen necesario para las reacciones de la

muestra y eluyendo con 10µl. Después de la purificación se volvió a verificar la calidad y cantidad de PCR por medio de densitometría en geles de agarosa al 2% teñidos en EtBr (0.5µg/ml) durante 30 minutos. Se ajustó la cantidad de producto de PCR hasta asegurar una concentración de 50 ng/µl de ADN en volúmenes de 10-15 µl. Finalmente fueron enviados para su secuenciación automática a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) donde se realiza el proceso en equipos ABI-3730xl usando terminadores marcados con BigDye.

Las secuencias del ADNmt se alinearon con el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) en BioEdit (Hall 1999) para posteriormente analizar diferenciación, distribución geográfica de la variabilidad, estructura genética y filogenia entre secuencias y entre poblaciones, usando los programas MEGA 4 (Kumar *et al.* 2004) y Arlequín ver 3.11 (Excoffier *et al.* 2006).

Se compararon las secuencias obtenidas con aquellas reportadas en la literatura (Allard *et al.* 1994; Encalada *et al.* 1996; Bjorndal and Bolten, sin publicar), en la base de datos mundial para tortuga verde del Archie Carr Center for Sea Turtle Research (<http://accstr.ufl.edu/cmmtdna.html>) además de las del laboratorio de Genética de la Unidad Académica Mazatlán del ICML de la UNAM, (Abreu-Grobois *et al.* 1996) y otras que son parte de trabajos en proceso. Se compilaron todas las secuencias disponibles alineadas y en formatos compatibles (FASTA) para posteriormente caracterizar los haplotipos presentes, estimar la frecuencia de cada uno en las poblaciones muestreadas y someter los datos a los análisis estadísticos.

7.5. Diversidad genética intrapoblacional

Con el programa Arlequín se evaluaron los niveles intrapoblacionales de diversidad genética. La diversidad de haplotipos (h , Nei 1987), definida como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes fue evaluada por la siguiente fórmula.

$$h = \frac{n(1 - \sum_{i=1}^l x_i^2)}{n-1}$$

Donde:

h =diversidad haplotípica,

n =número de individuos analizados

x_i =frecuencia de cada alelo

l =número de haplotipos únicos detectados.

También se estimó la diversidad nucleotídica (π) de acuerdo a Nei (1987), definida como la probabilidad de que dos nucleótidos elegidos al azar sean diferentes, lo que nos indica el número promedio de diferencias por sitio entre pares de haplotipos dentro de una población. La fórmula empleada es:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde:

x_i y x_j =frecuencias de los haplotipos i y j

π_{ij} =número de mutaciones ocurridas desde la divergencia de los haplotipos i y j (distancia genética)

k =número de haplotipos

n =tamaño de muestra

7.6. Relaciones genealógicas entre secuencias

Las relaciones evolutivas entre los haplotipos reportados para *Chelonia mydas* en el Atlántico, se realizó mediante el programa TCS v. 1.2.1 (Clement *et al.* 2000) que incorpora una estadística parsimoniosa (descrita en Templeton *et al.* 1992) para la unión más parsimoniosa (al 95%) entre todas las secuencias analizadas. En el resultado, la representación del TCS indica el número y ubicación de sitios de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos. Para evitar ambigüedades, las inserciones de más de 2 bp en el conjunto de secuencias fueron recodificadas a indels sencillos de 1 sola base con el fin de que se evaluaran en el TCS como un solo evento de mutación.

7.7. Diversidad genética interpoblacional

Para estos análisis, las relaciones entre haplotipos observados se evaluaron en dos modalidades (Moritz *et al.* 2002): por medio de estimaciones de la F_{ST} convencional (Wright 1951) el cual toma en cuenta únicamente las frecuencias haplotípicas; y con el Φ_{ST} que es un equivalente del F_{ST} que además de las frecuencias considera las distancias genéticas entre los haplotipos. Para este último estadístico se empleó el modelo de Kimura 2 parámetros.

Mediante el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA Excoffier *et al.* 1992) en Arlequín ver 3.11 (Excoffier *et al.* 2006), se evaluó la distribución de la variabilidad genética (estructura genética) dentro y entre colonias. Este procedimiento incluyó la evaluación de diversas agrupaciones de las colonias analizadas en este trabajo y las demás que han sido reportadas para el Atlántico y las del Caribe mexicano. La significancia estadística de estas evaluaciones se alcanzó por medio de 10,000 permutaciones (Manual de Arlequín ver. 3.11). Este análisis al igual que el de relaciones entre los haplotipos, se realizó en las dos

modalidades, es decir, con frecuencias haplotípicas y con distancias genéticas con Kimura 2 parámetros.

Las evaluaciones del flujo génico (Nm , número absoluto de migrantes que son intercambiados entre dos colonias por generación) entre poblaciones del Caribe mexicano y con respecto a otras de la región estudiadas previamente se realizó por medio del análogo de F_{ST} (Φ_{ST}) del algoritmo de análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequín y usando la ecuación (Nei 1987):

$$Nm = \left(\frac{1 - \phi_{ST}}{2\phi_{ST}} \right)$$

7.8. Reconstrucción de relaciones filogenéticas entre poblaciones

Se reconstruyeron las relaciones filogenéticas tanto entre poblaciones de Quintana Roo como entre las de Quintana Roo y las de la cuenca del Atlántico partiendo de la matriz de distancias genéticas (F_{ST}) obtenidas por el programa Arlequín. El árbol filogenético utilizado se construyó por medio de los algoritmos UPGMA (Nei y Kumar 2000) en el programa MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.* 2004).

7.9. Aislamiento por distancia

Para determinar si los patrones de diferenciación genética observados entre las poblaciones estudiadas obedecen un modelo de aislamiento por distancia, se realizó un análisis de correlación entre distancias geográficas ($\ln[\text{km}]$) y genéticas (valor de F_{ST} linearizado de Slatkin 1993). La distancia geográfica entre las colonias a donde se desplazan las tortugas, se realizó mediante el programa Google earth. La significancia del modelo se determinó con la prueba de Mantel en el programa GenAlex versión 6 (Peakall y Smouse 2006) con 10,000 permutaciones.

7.10. Análisis de Rarefacción

Si bien FitzSimmons *et al.* (2000) mencionan que con una muestra de 30-50 individuos se obtiene suficiente robustez estadística para un análisis de estructura genética de las poblaciones, debido al número inusualmente alto de haplotipos por colonia en combinación con frecuencias haplotípicas relativamente equilibradas en este trabajo, se presentaron dificultades para lograr estimaciones precisas de las frecuencias haplotípicas. Evidentemente, en este contexto, el tamaño de muestra que mencionaban FitzSimmons *et al.*

(2000) como ideal no aplica y fué necesario evaluar la relación entre tamaño de muestra y el número de haplotipos detectable para las poblaciones individuales y globalmente en la región. Para esta evaluación se aplicó el análisis de rarefacción. Este análisis propuesto por primera vez por Sanders en 1968, fue corregido por Hurlbert (1971) y por Simberloff (1972), sirve para calcular el número de especies esperadas en el caso de que hubiese muestras de distinto tamaño pero provenientes de un mismo universo de especies (Siegel y German, 1982). Este análisis se puede aplicar para calcular el número promedio esperado de variantes en un grupo de datos al realizar un remuestreo hipotético de submuestras de una colección más grande, para determinar si se puede esperar que las diferentes submuestras pertenezcan a la misma población global (Simberloff 1978).

La curva de rarefacción se define como el número esperado de grupos no vacíos representado por una muestra aleatoria de n unidades de la original N unidades, de esta manera se calcula el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar, es decir, si la muestra fuera considerada de n individuos ($n < N$) (Siegel y German 1982; Moreno 2001)

$$E(s) = \sum 1 - \frac{\frac{N - N_i}{n}}{\frac{N}{n}}$$

Donde:

$E(S)$ es el número de clases esperada en la muestra rarificada

N = número total de observaciones por celda, en la muestra rarificada

N_i = número de individuos en la i -ésima, de muestra rarificada

n = Tamaño de muestra estándar especificada por el usuario

La curva de rarefacción determina la relación entre el tamaño de muestra y el número de haplotipos detectable para el conjunto de colonias, o individualmente para cada playa, teniendo como resultado un máximo de haplotipos (S_{\max}) (Formia *et al.* 2007). Se utilizó un macro diseñado por el Dr. H. Aguirre para calcular la curva de rarefacción. Con éste, el número máximo de haplotipos esperado se obtiene con sub-muestreos al azar del conjunto de colonias, lo que nos da un límite superior y otro inferior y la posición de la curva entre estos límites proporciona una medida de uniformidad de la diversidad (Siegel y German, 1982). Para ajustar la curva se aplicó la ecuación de Michaelis-Menten que es un modelo asintótico de uso común (Colwell y Coddington 1994).

Ecuación de Michaelis-Menten:

$$S(n) = \frac{S_{\max} * n}{B + n}$$

Donde:

$S(n)$ es el número de haplotipos en función del tamaño de la muestra n

S_{max} = asíntota

B = Tasa de disminución de la pendiente.

Suponiendo que un finito número total de los haplotipos se produce en la anidación y está representado por la asíntota, fue posible evaluar el tamaño de la muestra necesario para detectar una proporción deseada del número máximo de haplotipos que se han estimado.

Para evaluar la dispersión alrededor de las estimaciones de frecuencias haplotípicas causadas por diferentes tamaños de muestra, se calcularon coeficientes de variación mediante un programa de remuestreo generado por el Mat. Germán Ramírez, tomando como referencia la composición haplotípica de la población de Kanzul.

7.11. Contribución de colonias mexicanas a hábitat de alimentación en el Atlántico

La información de composición haplotípica de las colonias de tortuga verde en México, en conjunto con las del resto de poblaciones de la cuenca Atlántica previamente estudiadas, se utilizó como insumo para estimar los niveles en que cada una contribuye a sitios de alimentación en la región en donde se han registrado por lo menos uno de los haplotipos de colonias del Caribe mexicano: Bahamas (Lahanas *et al.* 1998), Carolina del Norte, EUA (Bass *et al.* 2006), Nicaragua (Bass y Witzell 2000), Barbados (Luke 2004). Para esta evaluación se utilizó un algoritmo de máxima verosimilitud que realiza un análisis de mezcla de stocks ("MSA", por sus siglas en inglés; Pella y Milner 1987) en SPAM versión 3.7 (ADGF [Alaska Department of Fish and Game] 2001; Debevec *et al.* 2000) y deriva valores de contribución porcentual e intervalos de confianza.



8. RESULTADOS

Se lograron amplificar 233 muestras provenientes de ocho playas (n=234) de ambas temporadas, de éstas un 91% (213 muestras) generó secuencias (Tabla 8.1). Las secuencias fueron alineadas con respecto a los haplotipos de referencia que se encuentran registrados para tortuga verde del Atlántico en la base de datos para esta especie en el Archie Carr Center for Sea Turtle Research (ACCSTR) (<http://accstr.ufl.edu/cmmtdna.html>). De esta manera se caracterizaron los conjuntos de haplotipos presentes y las frecuencias absolutas de cada población para abordar los objetivos de esta tesis.

Tabla 8.1. Total de muestras procesadas en ADN, PCR y secuenciación, para las temporadas de anidación 2005 y 2006.

		A	B	C	D	E	
Playa	Temporada	muestras Obtenidas	# muestras con producto PCR	% de muestras de las que se obtuvo PCR (B/A)	# muestras secuenciadas	% de muestras secuenciadas (D/A)	
QUINTANA ROO	Holbox	2006	16	16	100%	16	100%
	Chemuyil	2006	10	10	100%	0	0%
	Aventuras-DIF	2005	1	1	100%	1	100%
	Xel-Há	2005	2	2	100%	2	100%
		2006	10	10	100%	0	0%
		suma	12	12	100%	2	17%
	Cozumel	2006	28	28	100%	28	100%
	X'cacel	2005	16	16	100%	16	100%
		2006	47	47	100%	47	100%
		suma	63	63	100%	63	100%
	Kanzul	2005	10	9	90%	9	90%
		2006	63	63	100%	63	100%
		suma	73	72	99%	72	99%
	Cahpechen	2005	4	4	100%	4	100%
2006		27	27	100%	27	100%	
suma		31	31	100%	31	100%	
Total Q. Roo		234	233	100%	213	91%	

8.1. Composición haplotípica de las colonias

Las 213 muestras del Caribe mexicano secuenciadas corresponden a 7 localidades. Las muestras de la colonia de Chemuyil no fueron secuenciadas por limitaciones de presupuesto y porque el tamaño de muestra era demasiado bajo). De las colonias de Xel-Há y Aventuras-DIF sólo se cuenta con 2 y 1 secuencias respectivamente (Tabla 8.3, Anexo V), por lo que estas dos localidades se excluyeron de algunos análisis de comparación entre pares de



poblaciones pero sus datos sí fueron incluidos en la agrupación global de secuencias de Quintana Roo. Para caracterizar los haplotipos con respecto a las secuencias de referencia en el catálogo del ACCSTR, se truncaron las longitudes de las secuencias de aprox. 900 pb, a los 480pb hasta ahora longitud estándar con lo que se identificaron un total de 9 haplotipos (Tabla 8.3).

Posteriormente se analizó la porción adicional que se logró secuenciar con los nuevos oligonucleótidos para identificar posibles polimorfismos. No se encontraron nuevos sitios variables en la porción 5' (12 sitios hacia esa dirección del inicio de las secuencias de referencia), sin embargo, al inspeccionar las 420 pb adicionales que se obtuvieron en la porción 3', se encontró un sitio polimórfico de haplotipos CM-A1 y CM-18 en la posición 629 posterior al inicio de la región control. En ambos, la variante involucra una inserción de una adenina. De acuerdo a las instrucciones del ACCSTR, la designación para los nuevos haplotipos se aplica dependiendo de las abundancias. Las secuencias con la ausencia de la inserción en la posición 629, que es la que aparece con mayor abundancia, fue denominada CM-A1.1 y la que se observó en menor frecuencia, que contiene la inserción (de una A) se le designó CM-A1.2. De igual manera para CM-A18 la secuencia sin la inserción se denominó CM-A18.1 y con inserción CM-A18.2. Cabe mencionar que el esclarecimiento del polimorfismo en el CM-A18 sólo fue posible al comparar secuencias con haplotipos analizados del Golfo de México para la tesis de O. Millán que forma parte del mismo proyecto de investigación ya que ninguna de las secuencias de Quintana Roo presentan inserción (Tabla 8.2).

El haplotipo CM-A1.1 se observó en 10 individuos de cuatro de las colonias estudiadas representando el 5% del total de las muestras. El haplotipo CM-A1.2 fue el más abundante con un 8% del total, encontrándose 18 individuos de cinco colonias. En las colonias de Cozumel y Holbox el CM-A1.2 se presenta con un alto porcentaje (25% para cada una) a pesar que fueron las colonias con menor tamaño de muestra, en el resto de las colonias se observó un porcentaje alrededor del 5%. En otros 13 individuos se observó el haplotipo CM-A18.2, que representa un 6% del total de muestras en Quintana Roo (Tabla 8.2). Por otro lado el CM-A18.2 también se presenta con una mayor frecuencia en esas mismas colonias (Holbox, 31% y Cozumel, 11%).

Como en la literatura aun no se ha tomado en cuenta este segmento de la región control, aun no se pueden hacer comparaciones con datos publicados, por lo que para el efecto de los subsecuentes análisis de diferenciación y estructura interpoblacional se registraron las muestras como CM-A1 y CM-A18 solamente.



Tabla 8.2. Presencia de nuevos haplotipos en las muestras de Quintana Roo agrupando los resultados de ambas temporadas para evitar sesgos por diferencias de cobertura.

playa	Abundancia de los nuevos haplotipos				Totales por playa
	CM-A1.1	CM-A1.2	CM-A18.1	CM-A18.2	
Holbox	0	4	0	5	16
Cozumel	1	7	0	3	28
X'cacel	5	2	0	2	63
Kanzul	3	4	0	2	72
Cahpechen	1	1	0	1	31
# total de muestras					210

8.1.1. Temporada 2005

Para la temporada del 2005 se secuenciaron 32 muestras de 5 playas, en las cuales se encontraron 7 haplotipos (Tabla 8.3). El tamaño pequeño de muestra obedece a que en ese año se presentaron dos huracanes que causaron la pérdida de muchos nidos y fue imposible coleccionar el número de muestras planeado. En la playa de Aventuras-DIF sólo se obtuvieron dos muestras y estaban repetidas (misma madre), por lo que sólo se contabilizó un solo individuo con el haplotipo CM-A3. De manera similar se tiene la playa Xel-Há en la que únicamente se cuenta con un haplotipo CM-A16 y otro CM-A22. X'cacel fue una de las playas de la cual se obtuvo una mayor cantidad de muestras (n=16) y el mayor número de haplotipos (No. haplotipos=7), el haplotipo CM-A3 con un 31%, seguido por los haplotipos CM-A1, CM-A22, CM-A26 con un 19% cada uno y por último el CM-A16 y CM-A17 con un 6% cada uno. Otra playa de las que se obtuvo muestra fue Kanzul (n=9) los haplotipos CM-A3 y CM-22 ambos con 33%, y con 11% cada uno de los haplotipos CM-A1, CM-A2 y CM-A16. Por último para esta temporada se tiene a Cahpechen con solo tres muestras y dos haplotipos el CM-A1 y CM-A3 presentado porcentajes de 25 y 75% respectivamente.

8.1.2. Temporada 2006

En esta temporada se lograron secuenciar 181 muestras repartidas en cinco playas y presentan un total de nueve haplotipos (Tabla 8.3). En la colonia de Holbox localizada hacia el norte de Quintana Roo, con sólo 16 muestras, los haplotipos CM-A1 y CM-A3 presentan una proporción del 25% cada uno, el CM-A16 fue el de menor frecuencia (19%) y en un 31% el haplotipo CM-A18.



En la Isla de Cozumel se pudieron distinguir 6 haplotipos y que, al igual que en la mayoría de las playas, el haplotipo más abundante fue el CM-A3 con 39%, seguido por el haplotipo CM-A1 con un 29%, el CM-A16 y el CM-A17 con 11% cada uno, y sólo con una muestra y un porcentaje del 4%, el haplotipo CM-A2.

Siguiendo la línea de costa hacia el sur de Quintana Roo, se localiza la playa de X'cacel, que es la playa con más anidaciones anuales del estado (1,400 nidos al año). Aquí se resolvieron un total de ocho haplotipos: CM-A1 (9% de los individuos), CM-A2 (15%), CM-A3 (28%), CM-A16 (11%), CM-A17 (15), CM-A18 (4%), CM-A22 (11%), CM-A28 (9%). A pocos kilómetros de distancia y también una de las más abundantes en anidaciones es la playa de Kanzul, que al igual que X'cacel es la más abundante en cuanto al número de haplotipos encontrados (9 haplotipos). Aquí, a diferencia de las otras colonias anidadoras, el haplotipo más abundante (27%) es el CM-A16 seguido del CM-26 con un 11%, CM-A3 y CM-A17 con 15%. Por último y también importante se tiene la colonia de anidación que se presenta en Cahpechen donde se observaron seis haplotipos: CM-A1 (9%), CM-A3 (37%), CM-A16 (33%), CM-A18 (4%), CM-A26 (15%), y CM-A28 (7%) (Fig. 8.12, pag. 43).

Tabla 8.3. Composición haplotípica de las colonias muestreadas en las playas de anidación de Quintana Roo en ambas temporadas.

Playas	Holbox		Aventuras		Xel-Há		Cozumel		X'cacel		Kanzul		Cahpechen		Totales por hapl	% por haplotipo
	Temporada	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006			
HAPLOTIPO	CM-A1	no muestreada	4					8	3	4	1	6	1	1	28	13.1
	CM-A2							1	7	7	1	7			16	7.5
	CM-A3		4	1				11	5	13	3	8	3	10	58	27.2
	CM-A16		3			1		3	1	5	1	17		9	40	18.8
	CM-A17									1	7		1		9	4.2
	CM-A18		5					3		2		2		1	13	6.1
	CM-A22					1				3	5	3	8		20	9.4
	CM-A26							2	3				11	4	20	9.4
	CM-A28									4		3		2	9	4.2
Totales por playa			16	1		2		28	16	47	9	63	4	27	213	100



En lo sucesivo se utilizarán abreviaciones para cada una de las poblaciones de la siguiente manera:

Región	Abreviatura	Población
Caribe mexicano	HB	Holbox
	CZ	Cozumel
	KZ	Kanzul
	CP	Cahpechen
	XC	X'Cacel
Gran Caribe	FL	Florida
	CR	Costa Rica
	SU	Surinam
	AV	Isla Aves
Atlántico sur Oriental	TI	Isla Trinidad Atolón de
	RA	Rocas
	AI	Isla Ascensión
	GB	Guinea Bissau
	BI	Isla Bioko
	ST	Santo Tomé
	CY	Chipre

8.2. Niveles de diversidad genética

En la población que anida en las costas del Caribe mexicano se han encontrado seis haplotipos endémicos (CM-A16, CM-A17, CM-A18, CM-A22, CM-A26 y CM-A28) lo que equivale a un 67% del total de haplotipos encontrados en este trabajo (endemismo haplotípico) y para el total de muestras ($n=213$) se encontró que un 52% de individuos, es decir 111 individuos, corresponden a haplotipos endémicos (individuos endémicos). Estos valores se pueden definir como altos en comparación con otras poblaciones de *C. mydas* que muestran valores de entre 14% (TI y RA) y 60% (CR) en cuanto a endemismo haplotípico y para valores de entre 1% (TI, RA y CR) y 25% (ST) en cuanto a individuos endémicos. Nótese que CR presenta un alto porcentaje de haplotipos endémicos, sin embargo, los individuos endémicos son pocos (5): en cambio, en Quintana Roo, ambos valores son altos.

Los valores de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) se calcularon individualmente para cada playa y en conjunto para Quintana Roo (Tabla 8.4). Los valores son altos comparando los datos con los ya publicados para esta especie en ambos parámetros (Fig. 8.1). X'Cacel y Kanzul fueron las colonias de anidación que mayor diversidad genética presentaron y ambas contienen nueve haplotipos (Tabla 8.4). Estos valores son indicativos de una riqueza haplotípica; los valores comúnmente altos de π , en comparación con otras



colonias del Atlántico también indican una amplia diversidad de linajes, particularmente las colonias de X'Cacel y Kanzul.

Tabla 8.4. Diversidad haplotípica y nucleotídica para las colonias de *C. mydas* en la literatura y las estudiadas en este trabajo

Colonias	<i>h</i>	error st (+/-)	π	error st (+/-)	NTot	No. hpl
I. Hutchinson, Florida (Caribe) ¹	0.562	0.047	0.0013	0.0012	24	3
Tortuguero, Costa Rica (Caribe) ^{1,2}	0.163	0.023	0.0033	0.0022	433	5
Q. Roo, México Encalada (Caribe) ¹	0.816	0.058	0.0052	0.0033	20	7
I. Aves, Venezuela (Caribe) ^{1,6}	0.186	0.088	0.0039	0.0026	30	2
Matapica, Surinam (S. América) ¹	0.257	0.142	0.0003	0.0005	15	3
Isla Trinidad, Brasil (S. América) ³	0.505	0.052	0.0012	0.0011	99	7
Atolón de Rocas, Brasil, (S. América) ³	0.520	0.076	0.0012	0.0011	53	7
I. Ascensión (S. América) ^{1,5}	0.299	0.034	0.0007	0.0008	70	8
Isla Bioko, Guinea Ecuatorial (África) ⁴	0.184	0.068	0.0004	0.0006	50	2
Santo Tomás (África) ⁴	0.584	0.127	0.0030	0.0021	20	7
Poilao, Guinea Bissau (África) ^{1,4}	0.000	0.000	0.0000	0.0000	70	1
Bahía Lara, Chipre (Mediterráneo) ^{1,6}	0.077	0.070	0.0002	0.0004	26	2
Holbox ⁷	0.792	0.045	0.0038	0.0026	16	4
Cozumel ⁷	0.762	0.053	0.0031	0.0022	28	6
X'Cacel ⁷	0.859	0.023	0.0057	0.0034	63	9
Kanzul ⁷	0.855	0.017	0.0062	0.0036	72	9
Cahpechen ⁷	0.738	0.053	0.0045	0.0029	31	6
Quintana Roo global ⁷	0.848	0.011	0.0054	0.0032	212	9

Referencias:

- ¹ Encalada *et al.* (1996)
- ² Bjorndal *et al.* (2005)
- ³ Bjorndal *et al.* (2006)
- ⁴ Formia *et al.* (2006)
- ⁵ Formia *et al.* (2007)
- ⁶ Naro-Maciel *et al.* (2007)
- ⁷ Este estudio

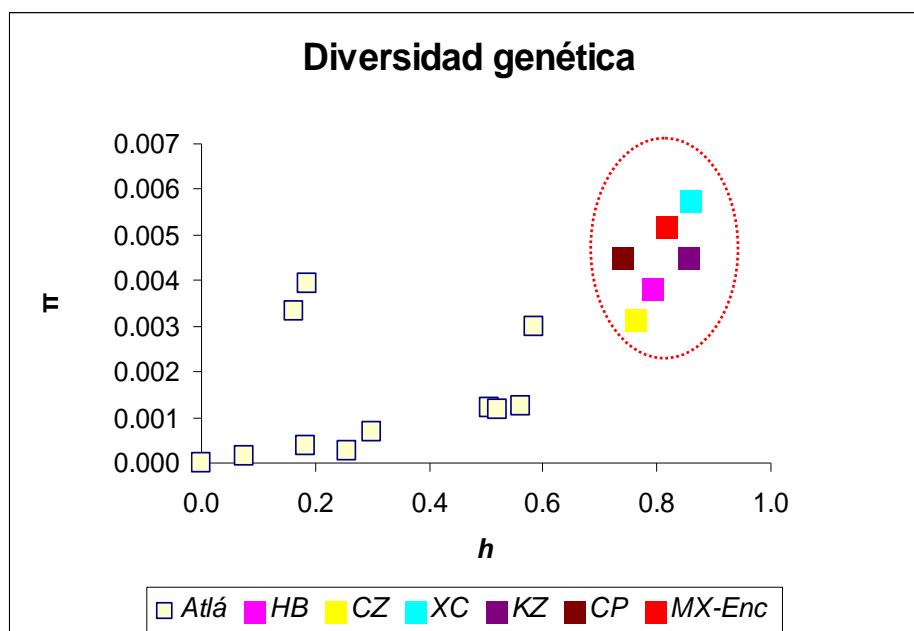


Figura 8.1. Comparación entre diversidad haplotípica y nucleotídica de las colonias del Atlántico (Atlá).

8.3. Relaciones genealógicas entre secuencias

Para determinar las relaciones genealógicas entre los haplotipos que se identificaron tanto en este estudio como en los reportados para colonias del resto de la cuenca Atlántica, se construyó una red de máxima parsimonia de los haplotipos en el programa TCS (Clement *et al.* 2000), basado en las diferencias nucleotídicas que se encuentran al comparar cada par de haplotipos para posteriormente construir la red más parsimoniosa con un 95% de confianza (Templeton 1992) (Fig. 8.2). Se distinguieron dos grandes linajes: **linaje A** conformado principalmente por haplotipos de las colonias del Caribe occidental y el Mediterráneo (Chipre); y el **linaje B**, conformado por secuencias encontradas en colonias del Caribe oriental, Atlántico Sur y Centro y del oeste de África.

El haplotipo CM-A8 parece ser el centro de diversificación de este linaje como fue identificado anteriormente por Encalada *et al.* en 1996. Por esta razón suponemos es el haplotipo ancestral o cercano a él y a partir de este se derivaron el resto de los haplotipos (Fig. 8.2). Éste se presenta en colonias del Atlántico sur y África. En este mismo linaje aparece el haplotipo CM-A5 que ha sido reportado en colonias dentro del Gran Caribe, con una alta proporción en las colonias de Costa Rica, Aves y Surinam, a diferencia de Quintana Roo donde se observó únicamente en un individuo (Encalada *et al.* 1996). Adicionalmente se puede notar que del haplotipo CM-A5 se derivan otros cuatro, dos de los cuales: CM-A20 y CM-A21 únicamente han sido reportados en Costa Rica (Bjorndal *et al.* 2005), el CM-A7 fue registrado en Surinam (Encalada *et al.* 1996) y el CM-A55, hasta ahora con origen



desconocido localizado en aguas de Brasil (Ubatuba) (Naro-Maciel *et al.* 2007). Es decir, que aparentemente a partir del haplotipo CM-A5 del linaje del Atlántico Sur-Central, se han originado tres nuevos haplotipos cuya localización está en la región del Gran Caribe. Es probable, por lo tanto, que el identificar el haplotipo CM-A5 no necesariamente indica una colonización por tortugas de poblaciones del Caribe occidental, ya que parece haberse establecido en Costa Rica hace suficiente tiempo evolutivo (miles de años) como para haber generado dos variantes derivados de él.

El linaje A, que se separa por 5 substituciones del grupo B, es el representado en la mayoría de los haplotipos de las colonias del Gran Caribe y particularmente en los de Quintana Roo (este estudio). Un rasgo sobresaliente de este linaje es que la separación entre los haplotipos de esta región (a excepción del haplotipo CM-A5) ha sido originado por una o dos diferencias. No obstante la homogeneidad geográfica de la representación en este linaje, también se observan los haplotipos CM-A13 y CM-A14 que se localizan en las colonias de Chipre, pero muy probablemente tengan su origen en el Gran Caribe y por algún motivo producto de una migración, se fijaron en Chipre, ya que estos se han localizado también en colonias de Cuba (A. Ruiz-Urquiola comunicación personal).

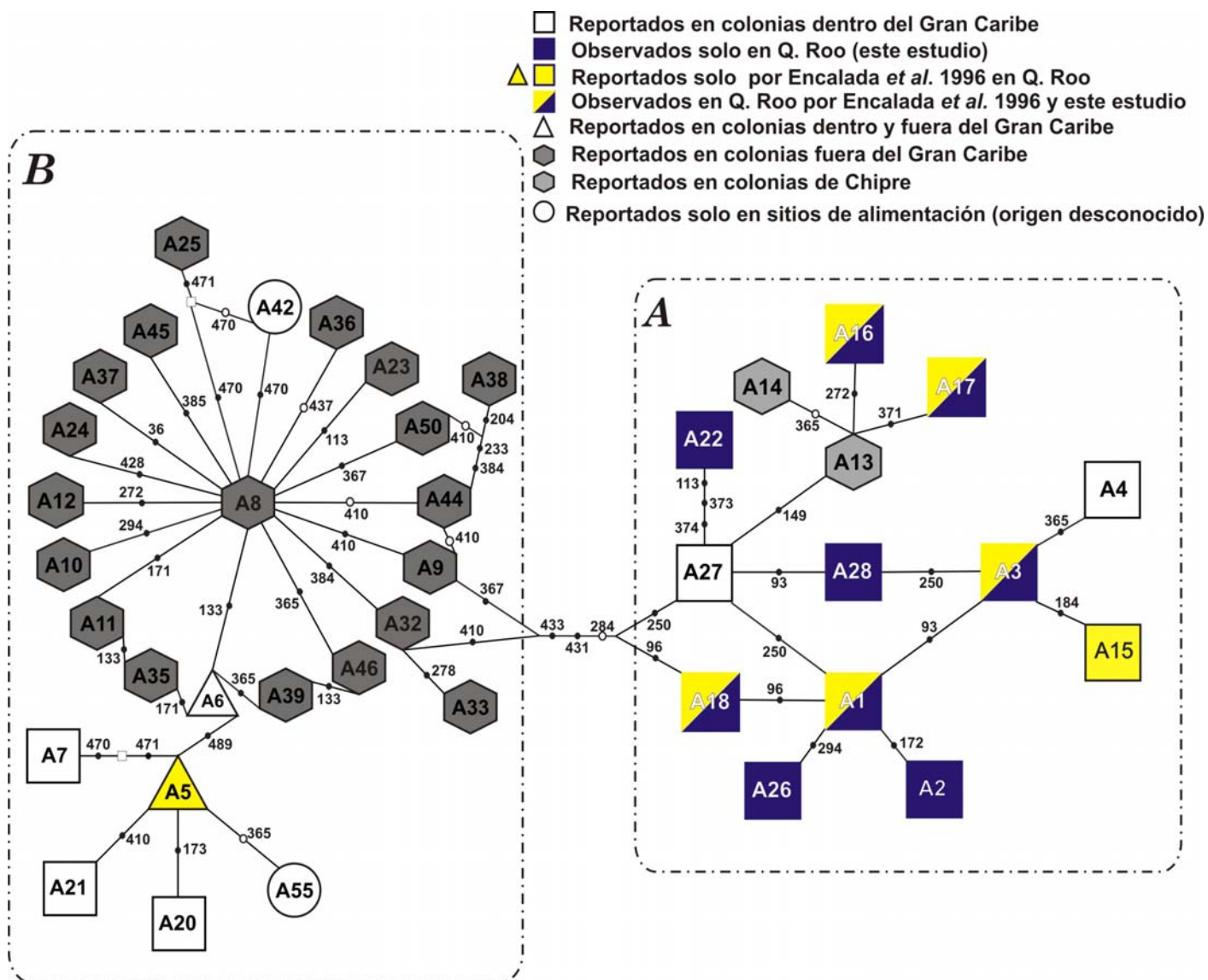


Figura 8.2. Red genealógica de máxima parsimonia (programa TCS, de Clement *et al.* 2000) para los haplotipos de la región control de colonias de tortuga verde del Atlántico y Mediterráneo. Las posiciones y número de sitios variables entre haplotipos están indicadas en las uniones; ●=transiciones, ○=transversiones, □ =inserciones de >2pb. La nomenclatura para los linajes A y B

Observando más detalladamente el grupo A, se distingue que el nexo con el clado Atlántico central se da a través del CM-A27 y el CM-A18 mientras que los haplotipos CM-A1 y CM-A3 parecen centros de diversificación dentro del linaje.

Incorporando en los tamaños de los cuadros una proporcionalidad con las abundancias relativas de los haplotipos (Fig. 8.3) se alcanza a distinguir que el haplotipo CM-A3 es el más abundante (27%), seguido del CM-A16 (19%). También se observa que el linaje de los haplotipos de colonias de Chipre (CM-A13 y CM-A14) se deriva del CM-A27. Por otro lado se tiene el CM-A16 y el CM-A17 que se encontraron en las colonias estudiadas, aparentemente se derivan del haplotipo observado solamente en Chipre, o de un ancestro común. Una explicación alterna podría ser a que la colonización de Chipre fuera a partir de



organismos del Gran Caribe caracterizados por una preponderancia de CM-A13 y A14 que sin embargo perduraron en el Gran Caribe para eventualmente dar lugar a CM-A16 y CM-A17.

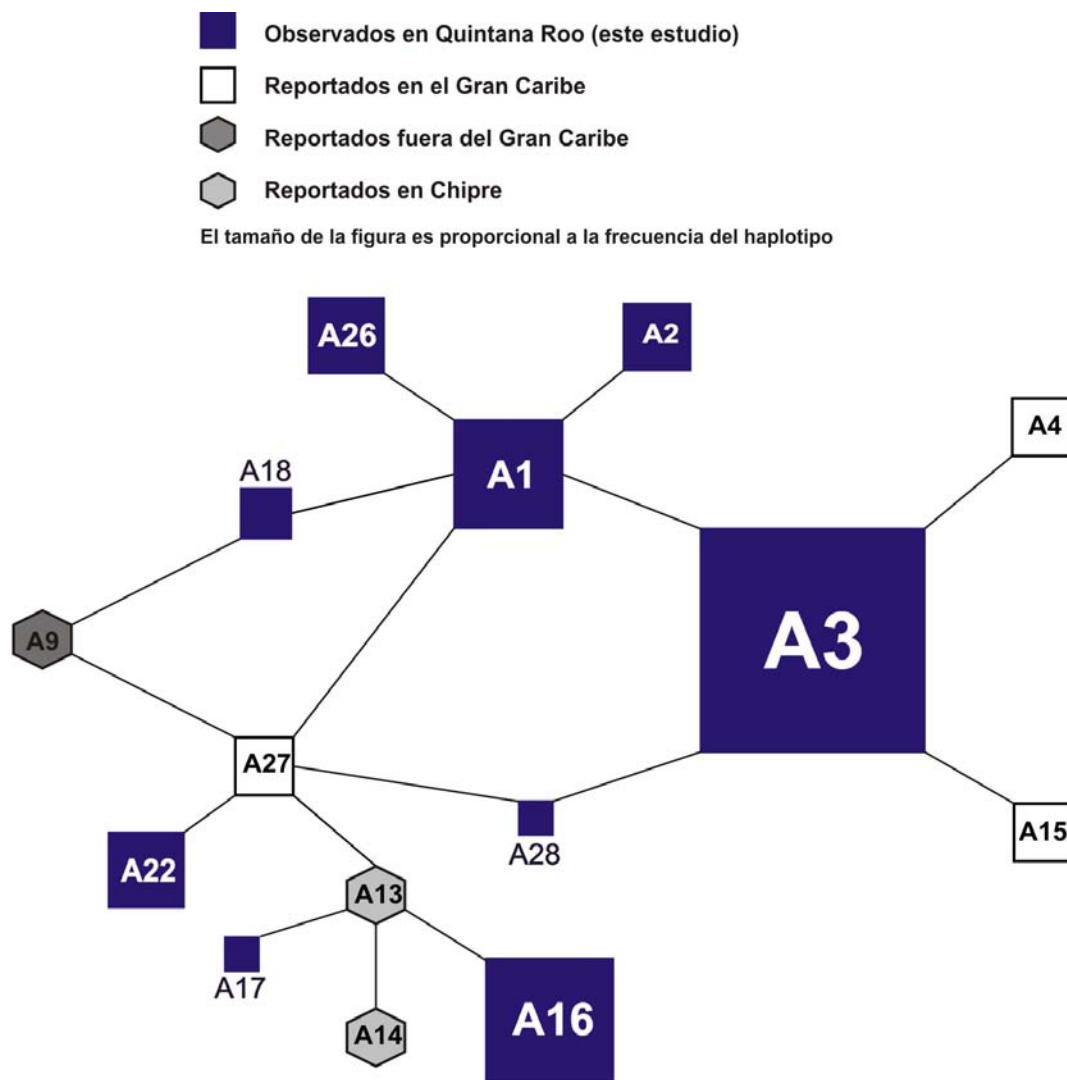


Figura 8.3. Red de máxima parsimonia TCS de los haplotipos que se encuentran principalmente en colonias del Gran Caribe con el tamaño de las cajas de los haplotipos encontrados en este estudio en proporción a las frecuencias observadas.

De la totalidad de los haplotipos encontrados en este estudio de colonias en el Caribe mexicano, cinco (CM-A1, CM-A3, CM-A16, CM-A17, CM-A18), ya se habían reportado en Quintana Roo (Encalada *et al.* 1996); pero tres (CM-A22, CM-A26, CM-A28) sólo habían sido reportados en áreas de alimentación (Bass y Witzell 2000; Bass *et al.* 2006) sin conocer



su origen, y uno (CM-A2) reportado con un solo individuo en la isla de Hutchinson, Florida (Encalada *et al.* 1996) que es una playa de anidación (Tabla 8.5).

Encalada *et al.* (1996) para su estudio en Quintana Roo, tomaron muestras de X'Cacel y Cozumel de sólo 20 individuos y aun con este tamaño de muestra lograron identificar siete haplotipos, dos de los cuales no se observaron en este estudio (CM-A5 y CM-A15 ambos encontrados con $n=1$). Notablemente uno de ellos (CM-A5) pertenece al linaje B de haplotipos de la región del Atlántico central, o bien de Costa Rica (Fig. 8.2, TCS). Este estudio con un tamaño muestral 10 veces mayor ($n=213$) se observan cinco haplotipos reportados por Encalada *et al.* (1996) y otros cuatro que se registran por primera vez para México. No se puede explicar la ausencia de CM-A5 ni de CM-A15 a menos de que esté presente en frecuencias mucho menores de las reportadas anteriormente. Alternativamente, dado que el muestreo de Encalada *et al.* (1996) involucró tortugas adultas en proceso de anidación, podría ser que las portadoras de estos haplotipos no observados fueron reproductoras en tránsito y no representativas de la población reproductora estable.



Tabla 8.5. Distribución de los haplotipos detectados en el Caribe mexicano comparado con otras colonias del Atlántico que ya han sido reportados. Para Kanzul, X'Cacel y Cahpechen se agruparon los datos de ambas temporadas. (1 Encalada et al. (1996), 2 Bjrndal et al. (2005), 3 Bjrndal et al. (2006), 4 Formia et al. (2006), 5 Formia et al. (2007), 6 Naro-Maciel et al. (2007), 7Este estudio)

Haplotipo	COLONIAS DE ANIDACIÓN																		
	FL ¹	QR00-Enc. ¹	CR ^{1,2}	AV ^{1,6}	SU ¹	TI ³	RA ³	AJ ^{1,4,5}	BI ⁴	ST ⁴	GB ^{1,4}	CY ^{1,6}	HB ⁷	AV-DIF ⁷	XH ⁷	CZ ⁷	XC ⁷	KZ ⁷	CP ⁷
CM-A1	11	7											4			8	7	7	2
CM-A2	1															1	7	8	
CM-A3	12	5	395	3									4	1		11	18	11	13
CM-A4			1																
CM-A5		1	32	27	13					1									
CM-A6					1			11	5	1									
CM-A7					1														
CM-A8						67	36	204	45	13	70								
CM-A9						19	7	9											
CM-A10							2	5											
CM-A11						1	1												
CM-A12							5												
CM-A13												25							
CM-A14												1							
CM-A15		1																	
CM-A16		1											3		1	3	6	18	9
CM-A17		2														8	1		
CM-A18		3											5			3	2	2	1
CM-A20																			
CM-A21			2																
CM-A22			3												1		8	11	
CM-A23						6		1											
CM-A24						1		7											
CM-A25							1	1											
CM-A26																2	3	11	4
CM-A27																			
CM-A28																	4	3	2
CM-A32						4	1	1											
CM-A33						1													
CM-A35										1									
CM-A36										1									
CM-A37										1									
CM-A38										2									
CM-A39								1											
CM-A42																			
CM-A44								1											
CM-A45								1											
CM-A46								2											
CM-A50								1											
Total	24	20	433	30	15	99	53	245	50	20	70	26	16	1	2	28	63	72	31



8.4. Distribución geográfica de la variación genética

Para evaluar los niveles de diferenciación genética entre poblaciones se aplicaron los estadísticos de F_{ST} (Weir y Hill 2002) usando el paquete Arlequin ver. 3.11 (Excoffier *et al.* 2006) y se analizaron adicionalmente los efectos de temporadas de muestreo. En las evaluaciones se utilizaron dos modelos de diferenciación: teniendo en cuenta frecuencias haplotípicas exclusivamente (F_{ST} convencional) y con distancias genéticas (Φ_{ST}) usando el modelo de Kimura de 2 parámetros.

El efecto de temporada sólo pudo ser evaluado en Kanzul y X'Caclal ya que sólo estas colonias fueron muestreadas en ambas temporadas y con tamaños de muestra adecuados. Los resultados (Tabla 8.6) demostraron que no hay diferencias significativas entre temporadas por lo que se combinaron los datos de ambas temporadas de cada población y con ellos se realizaron los análisis subsecuentes.

Tabla 8.6. Evaluaciones de entre muestreos de dos temporadas para Kanzul y X'Caclal.

Comparaciones	Φ_{ST} - Kimura 2 P	F_{ST} - Frecuencias
Kanzul 2005 vs Kanzul 2006	0.019, p=0.246	0.021, p=0.234
X'Caclal 2005 vs X'Caclal 2006	0.004, p=0.349	0.013, p=0.223

8.4.1. Diferenciación interpoblacional utilizando el estadístico F_{ST}

Los valores de evaluaciones pareadas de F_{ST} claramente reflejan una marcada diferenciación entre las colonias estudiadas del Caribe mexicano y las del resto del Atlántico ($F_{ST} > 0.1$; Tabla 8.7). La única excepción podría ser Florida con respecto a Cozumel que refleja una no-diferenciación; y con respecto al resto de Quintana Roo los valores de F_{ST} son relativamente bajos (<0.17) pero significativos. En el caso de Cozumel habría de recordar que se obtuvo una muestra pequeña que podría afectar los resultados como se discute más adelante.

Entre las colonias dentro de Quintana Roo y considerando la distribución geográfica de las colonias, los resultados son inconsistentes. Señalan que algunos pares de colonias mantienen cohesión, HB-CZ, HB-CP, CZ-CP, CZ-XC, CZ-FL, mientras que KZ y CP se mantienen relativamente diferenciadas (Tabla 8.7).



Tabla 8.7. F_{ST} entre poblaciones. Las celdas sombreadas representan los valores **no** significativos a $\alpha \geq 0.05$

Pobs.	QUINTANA ROO					OTRAS COLONIAS DEL ATLÁNTICO										
	HB	CZ	KZ	CP	XC	FL	CR	SU	AV	TI	RA	AI	GB	BI	ST	CY
CZ	0.001															
KZ	0.063	0.066														
CP	0.063	0.030	0.043													
XC	0.052	0.028	0.024	0.041												
FL	0.117	0.013	0.171	0.143	0.101											
CR	0.630	0.488	0.577	0.468	0.483	0.509										
SU	0.471	0.450	0.361	0.458	0.363	0.568	0.815									
AV	0.558	0.512	0.409	0.515	0.407	0.621	0.803	-0.002								
TI	0.398	0.398	0.330	0.406	0.332	0.476	0.747	0.564	0.601							
RA	0.376	0.375	0.304	0.384	0.306	0.463	0.767	0.566	0.617	0.004						
AI	0.593	0.587	0.515	0.591	0.520	0.644	0.777	0.707	0.723	0.072	0.057					
GB	0.815	0.745	0.569	0.741	0.584	0.838	0.867	0.953	0.943	0.191	0.218	0.053				
BI	0.617	0.577	0.452	0.579	0.460	0.675	0.834	0.795	0.815	0.102	0.094	0.006	0.102			
ST	0.317	0.321	0.257	0.332	0.256	0.428	0.778	0.543	0.625	0.032	0.014	0.060	0.352	0.098		
CY	0.625	0.573	0.446	0.575	0.452	0.688	0.848	0.855	0.865	0.627	0.650	0.741	0.979	0.855	0.694	

Un dendrograma UPGMA (Fig. 8.4) de los resultados permite una revisión esquematizada con la que se evidencia: (1) la separación sustancial del cluster de las poblaciones del Caribe mexicano, del cercanamente asociado de Florida, y (2) un agrupamiento notorio entre las dos islas muestreadas (HB y CZ) separadas del resto de las colonias continentales. Este agrupamiento implicaría la presencia de dos unidades demográficas, una para las colonias insulares y otra para las continentales, ambas independientes de la colonia de Florida a pesar de su cercanía filogenética.

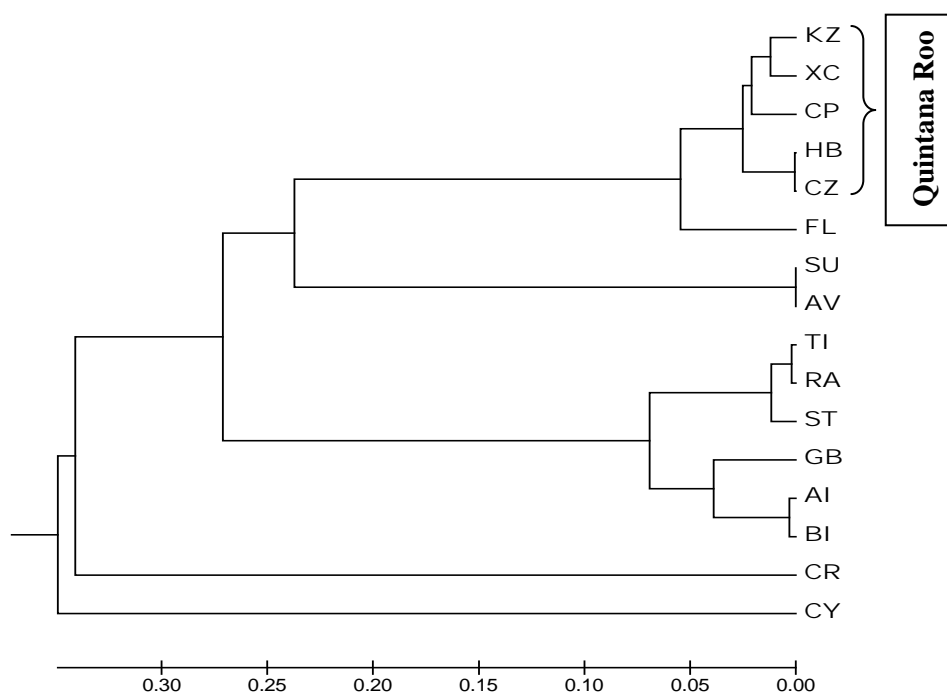


Figura 8.4. Dendrograma UPGMA de distancias genéticas construido a partir de la matriz del F_{ST} . Valores de la matriz de diferenciación de F_{ST}



8.4.2. Diferenciación interpoblacional utilizando el estadístico Φ_{ST}

Cuando se utiliza en el estadístico Φ_{ST} que toma en cuenta tanto distancias genéticas como frecuencias haplotípicas, los patrones son muy similares a los observados en la sección anterior aunque los valores absolutos tienden a ser menores mediante este estadístico (Tabla 8.8). Nuevamente se evidencian los valores más bajos entre HB y CZ, mientras que el grado de significancia entre las demás colonias no muestra un patrón de diferenciación definido.

Tabla 8.8. Φ_{ST} entre poblaciones usando el modelo de 2 parámetros de Kimura. Las celdas sombreadas representan los valores **no** significativos a $\alpha \geq 0.05$

Pobs.	QUINTANA ROO					OTRAS COLONIAS DEL ATLÁNTICO									
	HB	CZ	KZ	CP	XC	FL	CR	SU	AV	TI	RA	AI	GB	BI	ST
CZ	0.005														
KZ	0.058	0.084													
CP	0.048	0.044	0.042												
XC	0.047	0.050	0.012	0.033											
FL	0.162	0.018	0.166	0.150	0.108										
CR	0.268	0.171	0.350	0.228	0.262	0.118									
SU	0.890	0.894	0.773	0.853	0.788	0.956	0.848								
AV	0.780	0.806	0.724	0.779	0.736	0.850	0.812	0.019							
TI	0.886	0.891	0.795	0.870	0.812	0.921	0.824	0.782	0.654						
RA	0.877	0.881	0.763	0.851	0.783	0.925	0.820	0.801	0.617	0.018					
AI	0.941	0.942	0.890	0.933	0.900	0.955	0.867	0.847	0.777	0.076	0.050				
GB	0.951	0.942	0.815	0.913	0.835	0.980	0.836	0.988	0.750	0.102	0.093	0.011			
BI	0.917	0.913	0.784	0.881	0.803	0.958	0.829	0.907	0.648	0.093	0.077	0.005	0.102		
ST	0.795	0.822	0.713	0.784	0.728	0.882	0.814	0.630	0.438	0.093	0.069	0.109	0.168	0.059	
CY	0.668	0.682	0.310	0.502	0.359	0.872	0.649	0.989	0.878	0.932	0.944	0.958	0.997	0.980	0.914

El dendrograma UPGMA de esta matriz (Fig. 8.5) nuevamente agrupa CZ y HB en un cluster separado de las colonias continentales de Quintana Roo, y todas éstas a su vez diferenciadas claramente tanto de Florida y Costa Rica como el resto del Atlántico.

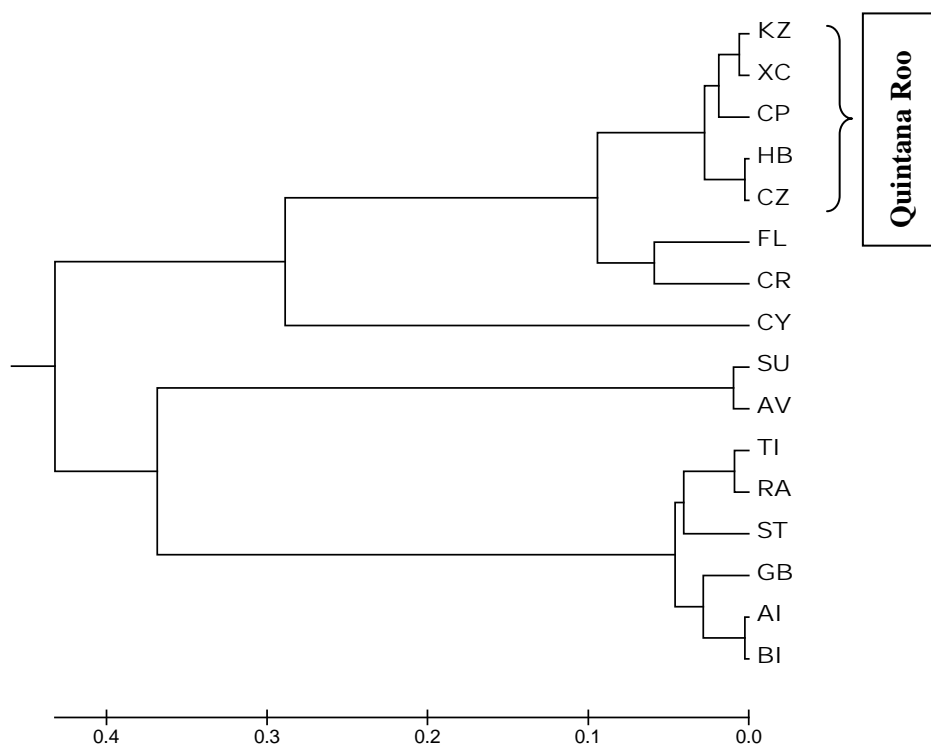


Figura 8.5. Dendrograma UPGMA de distancias genéticas construido a partir de la matriz del Φ_{ST} , Kimura 2p.

Valores de la matriz de diferenciación de Φ_{ST} .

La interpretación más congruente de los resultados de estas pruebas, indicaría una entidad poblacional que abarca Holbox y Cozumel y otra de las poblaciones continentales del estado que se concentran en la zona central. Sin embargo, hay consideraciones de importancia que deben tomarse en cuenta. Por un lado, los tamaños muestrales no fueron equivalentes y el número de muestras de las dos islas ($N= 16$ y 28) fueron los menores en el trabajo, lo que se refleja también en un número reducido de haplotipos detectados ($NH= 4$ y 6 para HB y CZ , respectivamente vs. 9 para XC y KZ). Esto, dentro de un contexto poblacional con un número excepcionalmente alto de haplotipos y con una distribución de frecuencias relativamente homogéneas puede estar sesgando los resultados. El problema es analizado en una sección más adelante.

Independientemente del análisis genético, existe otra línea de evidencia a partir de programas de marca-recaptura con placas metálicas realizados por los programas de conservación en el estado. Éstos indican la presencia de eventos migratorios entre X'cacel y Cozumel (distancias de menos de 50 km) y entre X'cacel y Holbox (aprox. 200 km) de acuerdo a información no publicada de Eduardo Cuevas (PRONATURA-Península de Yucatán, A.C.) y Julio Zurita (Flora, Fauna y Cultura de México, A.C.). Estas distancias caen dentro de los límites geográficos de las unidades de manejo observados en otros trabajos con la misma especie (ej. Dethmers *et al.* 2006).



8.5. Flujo génico entre colonias

El flujo génico en términos del número de migrantes por generación (Nm) evaluado entre las poblaciones a partir de distancias genéticas (Tabla 8.9) permite una visión complementaria de la estructuración evaluada en la sección anterior. Los resultados son esencialmente los mismos pero consistentemente se observan altos valores ($Nm > 5$) entre todos los pares de comparaciones de las colonias de Quintana Roo. Contemplando que valores de $Nm > 4$ son considerados reflejo de conectividad reproductiva (Slatkin 1995) estos resultados apoyan la noción de agrupar la totalidad de colonias de Quintana Roo en una sola unidad Mendeliana. Asimismo, se puede notar una disminución de los valores entre Florida contra colonias de Quintana Roo con Nm primordialmente entre 2.5 – 5.0 y los de Costa Rica contra Quintana Roo con Nm alrededor de 1. De los dos casos, la población de Cozumel es la que muestra un mayor flujo tanto hacia a Florida como a Costa Rica, lo que podría indicar alguna conectividad que tendría que ser analizada con mayor detalle.

Tabla 8.9. Flujo génico ($M=Nm$), a partir de la matriz de F_{ST} (Slatkin 1995). Los valores de $Nm \gg 5$ son resaltados con fondo gris.

Pobs.	QUINTANA ROO					OTRAS COLONIAS DEL ATLÁNTICO										
	HB	CZ	KZ	CP	XC	FL	CR	SU	AV	TI	RA	AI	GB	BI	ST	
CZ	91.41															
KZ	8.13	5.43														
CP	9.97	10.85	11.43													
XC	10.04	9.50	40.47	14.70												
FL	2.59	26.61	2.52	2.87	4.13											
CR	1.37	2.42	0.93	1.69	1.40	3.75										
SU	0.06	0.06	0.15	0.09	0.13	0.02	0.09									
AV	0.14	0.12	0.19	0.14	0.18	0.09	0.12	26.17								
TI	0.06	0.06	0.13	0.07	0.12	0.04	0.11	0.14	0.26							
RA	0.07	0.07	0.16	0.09	0.14	0.04	0.11	0.12	0.31	27.33						
AI	0.03	0.03	0.06	0.04	0.06	0.02	0.08	0.09	0.14	6.06	9.45					
GB	0.03	0.03	0.12	0.05	0.10	0.01	0.10	0.01	0.17	4.41	4.89	45.64				
BI	0.05	0.05	0.14	0.07	0.12	0.02	0.10	0.05	0.27	4.85	6.02	96.70	4.39			
ST	0.13	0.11	0.20	0.14	0.19	0.07	0.11	0.29	0.64	4.88	6.75	4.09	2.48	7.91		
CY	0.25	0.23	1.11	0.50	0.89	0.07	0.27	0.01	0.07	0.04	0.03	0.02	0.00	0.01	0.05	

8.6. Estructura poblacional

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) permite una visión complementaria para identificar el grado de estructuración de la variación genética entre y dentro de las poblaciones, analizando la distribución a diferentes niveles de organización geográfica. Este análisis se realizó tanto con base en medidas de F_{ST} entre pares de poblaciones con distancias genéticas (modelo de Kimura 2 parámetros) como solamente con las frecuencias haplotípicas.



Se establecieron tres regiones en las cuales se agruparon de diversas formas las poblaciones del Atlántico para evaluar los niveles de significancia del parámetro Φ_{CT} de las agrupaciones entre los grupos creados. Se evaluaron diversas agrupaciones regionales: (a) todo el Atlántico y Mediterráneo, agregando los datos generados en este trabajo a los ya publicados, (b) solamente el Gran Caribe (desde Florida hasta Surinam) y (c) solamente el Caribe Occidental (desde Florida hasta Costa Rica).

Las agrupaciones identificadas con valores de Φ_{CT} significativos reflejan conjuntos de poblaciones diferenciados genéticamente respecto a otros grupos. En el caso del total de las poblaciones (Tabla 8.10), se detectó una heterogeneidad genética hacia dentro de los grupos (Φ_{CT}) y de las poblaciones (Φ_{ST}) que parece ser característica de la especie. Este proceso se usó como complemento en la identificación de las unidades de manejo entre nuestras poblaciones.

Los resultados de los AMOVA realizados (Tabla 8.10) permite comparar y contrastar los valores del estadístico F_{ST} usando distancias genéticas o sólo frecuencias en los diferentes grupos geográficos formados. En evaluaciones que incluyen la totalidad de poblaciones que abarcan la diversidad genealógica entera, la proporción de la variación *entre* grupos es mayor cuando se aplican distancias genéticas que sólo frecuencias haplotípicas porque se subdivide de acuerdo la segregación geográfica de los linajes ya detectados en el TCS. Sin embargo cuando se agrupan poblaciones más emparentadas (Gran Caribe, Caribe occidental) donde prevalecen haplotipos de un solo linaje, la proporción de la variación *entre* grupos es mayor con la aplicación de estadísticos basados solamente en frecuencias (comparar en tabla 8.10). Por ejemplo, los valores de Φ_{CT} entre los mismos tres grupos de colonias de todo el Atlántico-Mediterráneo (agrupación B) fue más alto cuando se toman las distancias genéticas (72%) que al considerar sólo frecuencias (50%). En cambio en las agrupaciones con cuatro grupos (7 poblaciones; agrupación I) sólo del Caribe occidental este nivel contiene 21% de la variación genética cuando se aplica un modelo de distancia genética y 33% usando solo frecuencias.

Dentro del contexto regional objeto del presente estudio se pudieron identificar tres agrupaciones que muestran un valor de Φ_{CT} significativo ($\alpha < 0.05$) al aplicar F_{ST} convencional y podrían considerarse igualmente apoyadas desde el punto de vista estadístico de este análisis:

- Florida / Holbox-Cozumel-X'cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica
- Florida-Holbox-Cozumel / X'cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica
- Florida / Holbox-Cozumel / X'cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica



La primera agrupación resultó no significativa mediante el uso de distancias genéticas, aunque el valor de P está muy cercano al límite de significancia. Estas agrupaciones reflejan las ambigüedades observadas en los anteriores análisis, toda vez que se detectan asociaciones con Florida y las relaciones entre las poblaciones insulares y las continentales de Quintana Roo no se despejan completamente. En consecuencia con los resultados en secciones anteriores, se seleccionó la primera agrupación de esta lista ya que es congruente con una separación de las colonias localizadas en otros países y distanciados a más de 1,000 km de las colonias de Quintana Roo.

Tabla 8.10. Resultados del Análisis de Varianza Molecular a diferentes escalas geográficas y con diferentes agrupaciones. Se incluyen los valores de Φ_{CT} y sus valores de significancia de corridas de AMOVA utilizando el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2006). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns=no significativo

REGIÓN	# gpos	# pobs	Φ_{CT} - Kimura 2 parámetros			F_{ST} convencional		
			Φ_{CT}	Φ_{SC}	Φ_{ST}	Φ_{CT}	Φ_{SC}	Φ_{ST}
Atlántico y Mediterráneo	1 ^A	16	-	20.62	79.38***	-	41.41	58.59***
	3 ^B	16	71.71**	13.19***	15.1***	50.12***	16.22***	33.67***
Gran Caribe	1 ^C	9	-	48.74	51.26***	-	55.42	44.58***
	2 ^D	9	75.37*	5.43***	19.2	43.44*	20.5***	36.06***
Caribe occidental	1 ^E	7	-	77.33	22.67***	-	63.15	36.85***
	2 ^H	7	18.38 ns	6.78***	74.85***	30.49 ns	9.74***	59.78***
	3 ^G	7	19.58 ns	5.12***	75.3***	32.43*	7.17***	60.4***
	3 ^H	7	20.98*	3.03*	75.98***	32.49*	6.07**	61.44***
	4 ^I	7	20.86*	3.01*	76.13***	32.95*	5.46**	61.59***

<i>agrupación</i>	<i>Poblaciones y forma en que se agruparon para los AMOVA</i>
A	Todas las poblaciones del Atlántico individualmente
B	Chipre / Atlántico sur / Gran Caribe
C	Todas las poblaciones del Gran Caribe
D	Florida-Holbox-Cozumel-X'Cacel-Kanzul-Cahpechen-Costa Rica / Aves-Surinam
E	Florida-Holbox-Cozumel-X'Cacel-Kanzul-Cahpechen-Costa Rica
F	Florida-Holbox-Cozumel-X'Cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica
G	Florida / Holbox-Cozumel-X'Cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica
H	Florida-Holbox-Cozumel / X'Cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica
I	Florida / Holbox-Cozumel / X'Cacel-Kanzul-Cahpechen / Costa Rica

8.7. Aislamiento por distancia

Con el propósito de determinar si los patrones de diferenciación genética observados entre las poblaciones estudiadas obedecen un modelo de aislamiento por distancia, se realizó un análisis de correlación entre distancias geográficas (ln (km)) y genéticas (valor de F_{ST})



linearizado de Slatkin 1993). La significancia del mismo se determinó con la prueba de Mantel en el programa GenAlex (Peakall y Smouse, 2006) con 10,000 remuestreos. Cuando la prueba se realizó solamente con colonias separadas por menos de 250 km, como las poblaciones de Quintana Roo evaluadas en este estudio, se observó que no hay correlación significativa con $\alpha=0.05$ ($p=0.58$) y la correlación explica únicamente el 0.00008 de la variación (Fig. 8.6 a). Solamente cuando se incrementa el ámbito geográfico, extendiendo éste hasta separaciones de 5,500 km, para incluir todas las colonias de tortuga verde con datos en el Gran Caribe (Florida hasta Surinam) la asociación se convierte en significativa ($P=0.001$) y la correlación explica un 35% de la varianza (Fig. 8.6 b). No obstante esto refleja más bien la inclusión de colonias francamente diferenciadas y por la primera prueba se podría notar que no existen indicios de que este modelo realmente sea aplicable al área estudiada.

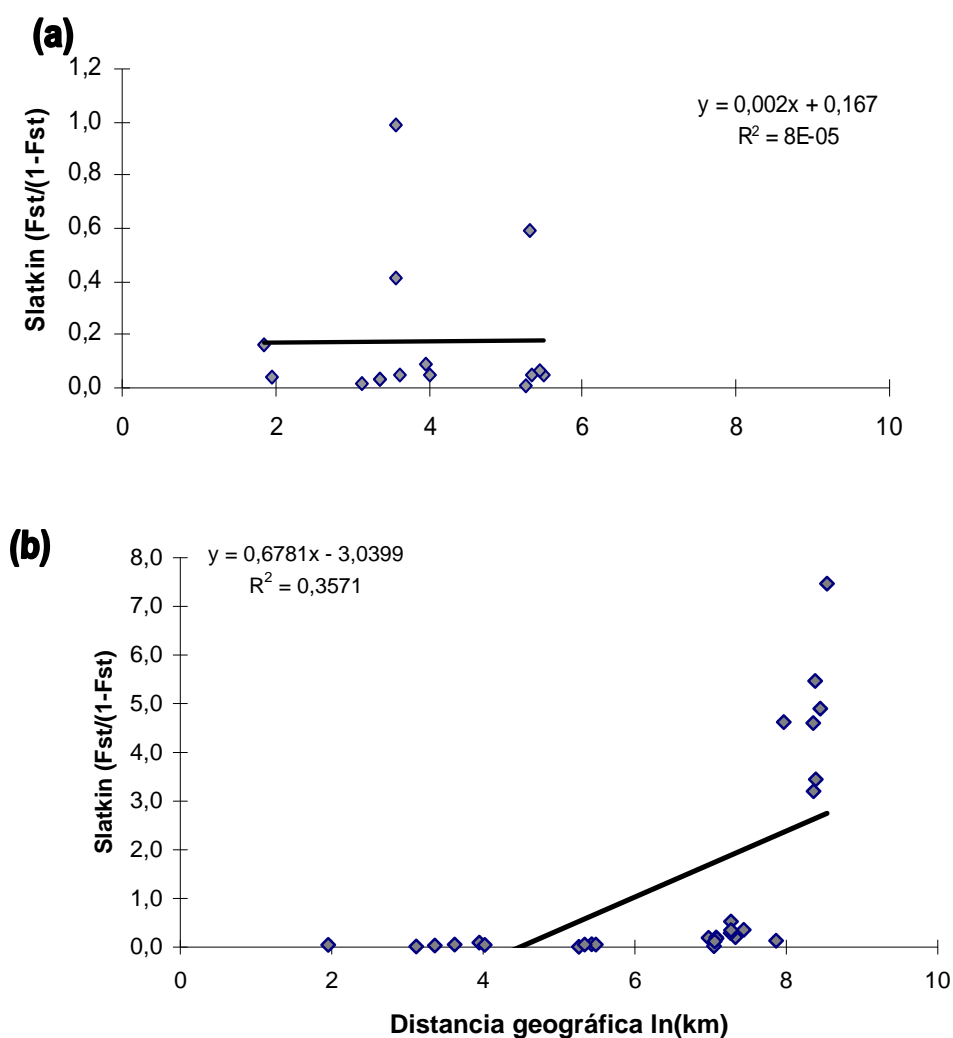


Figura 8.6. Diferenciación genética entre las poblaciones (a) de Quintana Roo (independientes), (b) Quintana Roo (independientes) Florida, Costa Rica y Aves-Surinam.



8.8. Análisis de Rarefacción

Debido al inusualmente alto número de haplotipos encontrados (nueve), a una distribución similar de frecuencias haplotípicas (también fuera de lo común) y resultados ambiguos y cercanos a la no significancia en evaluaciones de diferenciación entre poblaciones de Quintana Roo con bajos tamaños de muestra contra aquellas con tamaños altos, se cuestionó si las características de la composición genética estaría sesgando los resultados, creando falsos positivos, señalando diferenciación donde no existe.

Una de las posibles causas de diferencias interpoblacionales artificiales podría ser que no se encuentren todos los haplotipos en muestras pequeñas, creando así una fuente de error en la comparación entre poblaciones. Para analizar este escenario, se aplicó un análisis de rarefacción para determinar la relación entre el tamaño de muestra y el número de haplotipos detectados (Formia *et al.* 2007), así como los límites de confianza para la curva para dos propósitos en: (1) extrapolar el número más probable del total de haplotipos tanto en la población completa como en las colonias individuales, (2) con base en el anterior, estimar el tamaño de muestra necesario para detectar una proporción deseada de la variación haplotípica, y (3) evaluar si el número de haplotipos detectados en colonias con muestreos pequeños podría considerarse como equivalentes al de un subconjunto de una misma población más grande conteniendo el número total de haplotipos detectados en los muestreos mayores.

La curva de rarefacción derivada de todos los datos de los muestreos en Quintana Roo, que relacionan el número de haplotipos vs tamaño de muestra (Fig. 8.7) indica, como se esperaba, que conforme se aumenta el tamaño de muestra, el número de haplotipos se incrementa. Sin embargo, detectamos una asíntota al alcanzar 50 muestras. Esto no es lo esperado en el contexto de lo que aparece en la literatura para otras colonias de la especie que normalmente requieren menos de 200 muestras para alcanzar sus asíntotas (Formia *et al.* 2007) y refleja características de composición peculiares que se discuten más adelante. Usando una regresión no lineal con el programa Solver de Excel se obtuvo un buen ajuste de datos para la ecuación de Michaelis-Menten [$S(n) = S_{\max} * n / (B + n)$] ($R^2 = 0.98$) que sugiere un número asíntótico de haplotipos entre 9 y 10, ya que $S_{\max} = 9.5$. Los diez haplotipos que marca el modelo es casi el número de la haplotipos que se observaron en las muestras de Quintana Roo, es decir, se observó el 90% de la variación estimada. Se puede resaltar entonces que los tamaños de muestra de dos de las colonias de anidación (XC y KZ con $N = 63$ y 72 , respectivamente) rebasan el tamaño recomendable y los números de haplotipos detectados en ellas caen dentro de los límites de confianza de la curva. Por otro lado el



tamaño de muestreo de las tres poblaciones restantes (que incluyen HB y CZ) es menor. Más adelante se analiza con mayor detalle el resultado del análisis de para estas poblaciones.

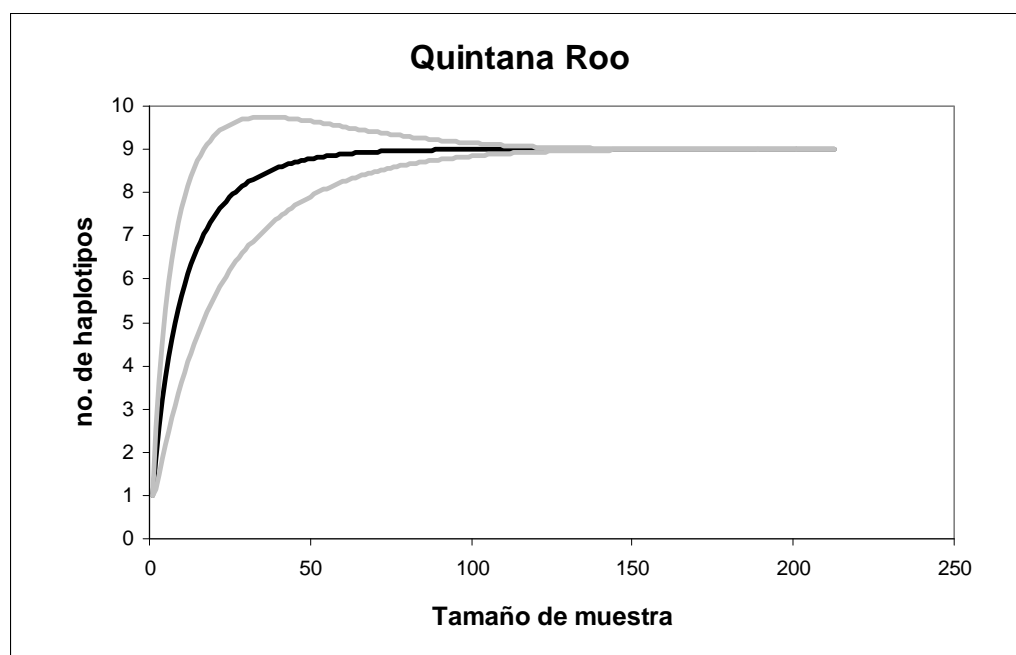


Figura 8.7. Curva de rarefacción para el total de datos sobre las colonias muestreadas de Quintana Roo. Las líneas negras denotan el número acumulado de haplotipos, las líneas grises demuestran el límite de confianza del 95%.

Para propósitos comparativos se replicó el análisis de rarefacción para los datos de Isla Ascensión (Tabla 3 de Formia *et al.* 2007) y Tortuguero (Tabla 1 de Bjorndal *et al.* 2005) que publicaron Formia *et al.* (2007) (Fig 8.8).

El análisis indica que para el caso de Quintana Roo, por su composición particular, con los tamaños globales de muestra utilizados o con las dos colonias mejor muestreadas ($N > 60$), particularmente cuando se conjunta el total de muestras de todas las colonias ($N = 211$), es muy probable que se haya detectado la totalidad de la variación genética en el locus estudiado.

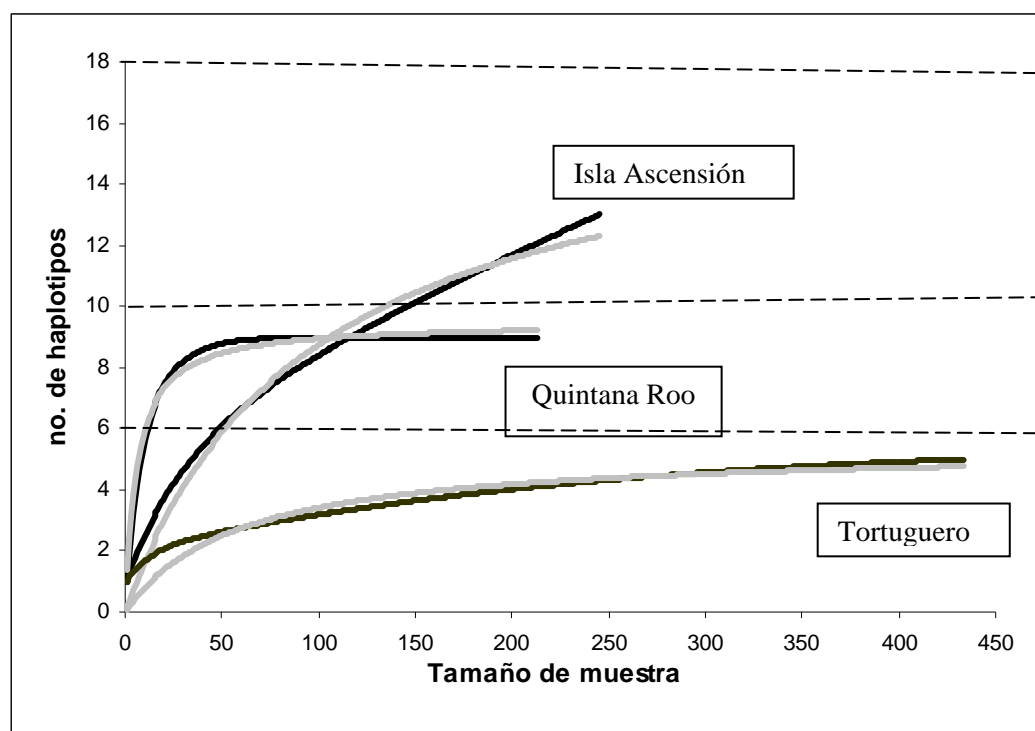


Figura 8.8. Curvas de rarefacción para el número de haplotipos de la región control del ADNmt encontradas en tres colonias de tortuga verde. Las líneas negras denotan el número acumulativo de haplotipos para incrementos en muestras, la línea gris los resultados del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten y las líneas discontinuas los valores asintóticos del número de haplotipos con base en la ecuación de M-M (S_{max}). (datos para Ascensión de Formia *et al.* 2007, y para Tortuguero de Bjoerndal *et al.* 2005)

Se analizaron también los datos de poblaciones individuales, de los que se obtuvieron igualmente curvas de rarefacción así como los parámetros de las ecuaciones (Tabla 8.11). Para todas las colonias estudiadas el número de haplotipos observado está por debajo del máximo estimado (valor asintótico). En HB, una de las colonias con menor número de muestra, el valor de S_{max} es de 5 (Tabla 8.11), en la Figura 8.9a se puede ver que la curva no llega a una asíntota, sin embargo, esta dentro del límite del 95%. En la colonia de XC que es una de las mejor muestradas, tampoco se logró llegar a su valor asintótico (10.6; Fig. 8.9b). Esto es una indicación adicional de la necesidad de incrementar la muestra en estas dos poblaciones para asegurar una evaluación completa de la composición haplotípica. Realizando una extrapolación se requieren aproximadamente 140 muestras en XC para llegar al 95% de confiabilidad y en KZ se requieren unas 125 muestras. Estos tamaños no serían imposibles de lograr y sería recomendable intentarlo en futuros análisis.

Por otro lado, para evaluar diferenciación entre poblaciones no es indispensable contar con la totalidad de la variación, pero la obtención de un porcentaje elevado es aconsejable



para que el perfil obtenido sea robusto. Si se considera, como alternativa un umbral del 85% de la variación, los resultados son más realistas e ilustrativos de los impactos sobre las evaluaciones haplotípicas realizadas. Bajo este umbral, los datos evidencian que mientras XC y KZ rebasan ampliamente el tamaño de muestra necesario para alcanzar el 85% de S_{max} , en las tres colonias restantes el muestreo queda muy pequeño o muy cercano. Justamente son esas tres colonias las que generan ambigüedades en las pruebas de diferenciación. Es interesante también conocer que el número máximo de haplotipos estimados para las colonias mejor muestreadas (XC y KZ) sugieren un valor mayor al observado (Tabla 8.11). El validar el número total de haplotipos necesitaría un muestreo adicional.

Tomando en cuenta el muestreo de colonias en Quintana Roo en su conjunto, el tamaño de muestra que se requiere para observar S_{max} con un 95% de confiabilidad es de 120 individuos, por lo que que la cantidad de muestras analizadas quedan por arriba de este número (213). Una probabilidad congruente con la suposición de que este conjunto de colonias conforman una sola unidad demográfica sería que el nivel real de variantes haplotípicas sea ligeramente por arriba de 9 y que se haya observado ese 95%. Interesantemente, esto también implica la presencia de otras variantes y entonces cabe la posibilidad de que los dos haplotipos reportados por Encalada *et al.* (1996) que no se encontraron en este estudio existan pero en frecuencias menores.

Por el contrario, en las colonias de Isla Ascensión y Tortuguero se necesitarían más de 1,000 muestras para observar el 95% de la variabilidad genética (datos de Formia *et al.* 2007 para AI y Bjorndal *et al.* 2005 para CR) (Tabla 8.11).

Tabla 8.11. Resultados de los análisis de rarefacción del número máximo estimado de haplotipos para poblaciones individuales de anidación en Quintana Roo. NH=Número de haplotipos

Colonia	NH obs.	N (muestras)	Michaelis-Menten				Fuente de los datos
			B (Tasa de disminución de la pendiente)	Smax (N)	N para 85% de Smax	N para 95% de Smax	
HB	4	16	2.9	5.0	15	40	Este estudio
CZ	6	28	6.4	8.0	40	170	Este estudio
XC	9	63	7.6	10.6	45	140	Este estudio
KZ	9	72	7.9	10.0	42	125	Este estudio
CP	6	32	7.1	8.0	38	115	Este estudio
QR (global)	9	213	5.8	9.5	33	120	Este estudio
AI	13	245	95.1	18.0	540	1,540	Formia <i>et al.</i> 2007
CR	5	433	58.3	6.0	340	1,100	Bjorndal <i>et al.</i> 2005

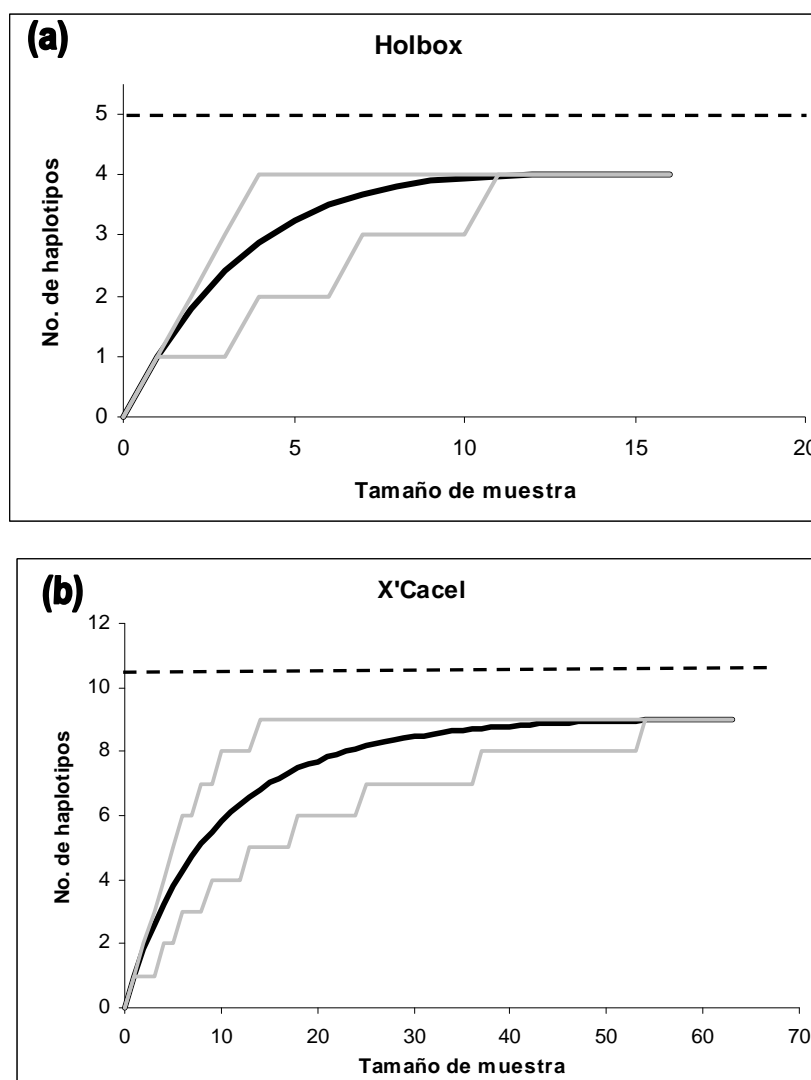


Figura 8.9. Curva de rarefacción para la playas de HB (a) y XC (b). Las líneas negras denotan el número acumulativo de haplotipos, las líneas grises demuestran el límite superior e inferior con el 95%, y con líneas discontinuas se observa la asíntota para S_{max} .

8.9. Impactos de la composición haplotípica en la precisión de las estimaciones de frecuencias

En los resultados se detectaron diferencias con altos niveles de significancia estadística entre pares de poblacionales incluyendo colonias que tienen tamaños de muestra por debajo del nivel crítico (95%) identificado en el análisis de rarefacción. Además, el no poder detectar el número de haplotipos posibles para el tamaño de muestra de este trabajo, pudiera afectar una evaluación efectiva de las diferencias genéticas. Es también posible que por los niveles de variación poco usuales en la composición haplotípica encontrada, es decir, niveles altos de haplotipos, y una distribución relativamente homogénea de las frecuencias de ellos, disminuya de manera importante la precisión para estimar su frecuencia. Para evaluar este fenómeno se



estudiaron los impactos que podría acarrear el efecto del tamaño de muestra bajo el escenario de la distribución de haplotipos y frecuencias observadas en Quintana Roo sobre la exactitud de las frecuencias haplotípicas. Si el impacto es considerable, los tamaños de muestra podrían estar generando un sesgo que enmascararía de los niveles de diferenciación inter-poblacionales.

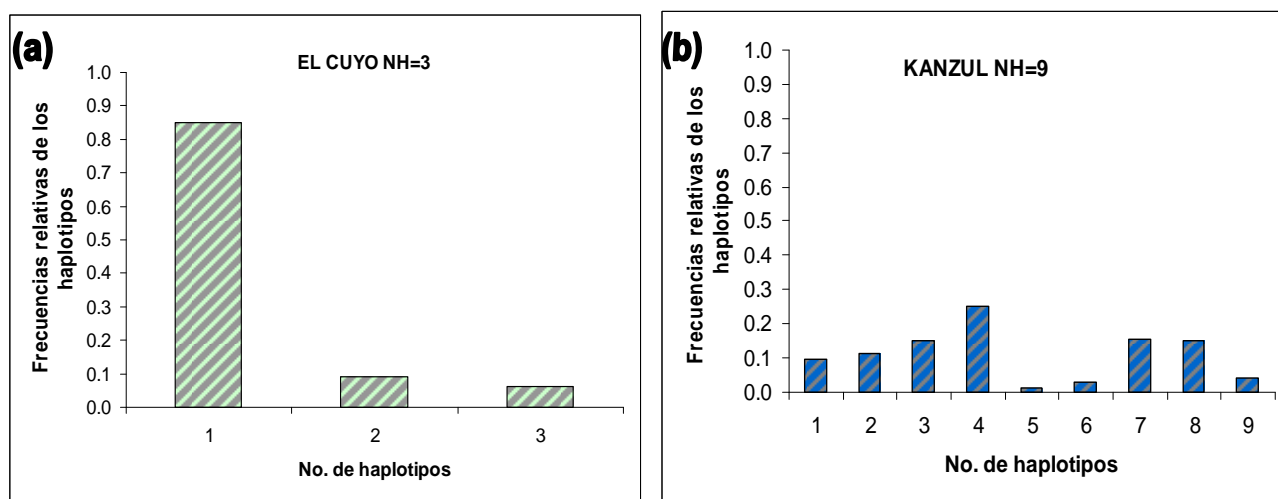


Figura 8.10. Distribución de frecuencias haplotípicas en a) una población con una composición haplotípica común (El Cuyo, de O. Millán, datos no publicados) y la composición haplotípica estimada para Kanzul en este estudio (b). NH=número de total de haplotipos observados; frecuencias relativas en el eje Y.

El número de haplotipos encontrados en la región control en las tortugas marinas, es típicamente de 1 a 3, generalmente concentrando la frecuencia en uno de ellos, como en el caso de la colonia de tortuga verde que anida en El Cuyo (Fig. 8.10 a; datos de O. Millán, no publicados). En nuestro caso, la composición es muy contrastante en los muestreos más numerosos de Kanzul y X'Cacl, para los cuales el análisis de rarefacción indicó una cobertura aceptable, que detectó la presencia de un alto número de haplotipos (N=9) y una distribución muy homogénea de frecuencias (Fig. 8.10 b). Inicialmente se consideró por los resultados de Ascensión y Tortuguero (ver sección anterior) que posiblemente se requerirían tamaños de muestra aun mayores para observar la totalidad de haplotipos, sin embargo, por el resultado del análisis de rarefacción no parece ser el caso del conjunto de colonias de Quintana Roo por lo que indica pruébale análisis y existe certeza de que se han detectado el 90% de los haplotipos presentes.



Para estimar el efecto del peculiar patrón de variación genética observada sobre los errores en la estimación de las frecuencias haplotípicas, se realizaron 10,000 remuestros de cada una de las frecuencias haplotípicas de las dos poblaciones que representan los dos extremos de distribuciones haplotípicas. Con esto se generaron estimaciones del coeficiente de variación (CV) para las frecuencias y se analizó su variación con respecto al tamaño de muestra a de poblaciones de El Cuyo (Fig. 8.11) y para Kanzul (Fig. 8.11 b).

Estos resultados indican la alta incertidumbre que se esperaría para las estimaciones de frecuencias haplotípicas en muestreos pequeños de $N < 50$ en ambos casos, pero la dispersión entre el valor mínimo y máximo es muchísimo mayor en el caso del perfil haplotípico de Kanzul. El tamaño de muestra para condiciones como Kanzul debería ser de $> 200-300$ individuos para lograr una variación similar a la más aceptable en los estudios de genética de poblaciones y para garantizar una mayor certeza en las comparaciones de diferenciación.

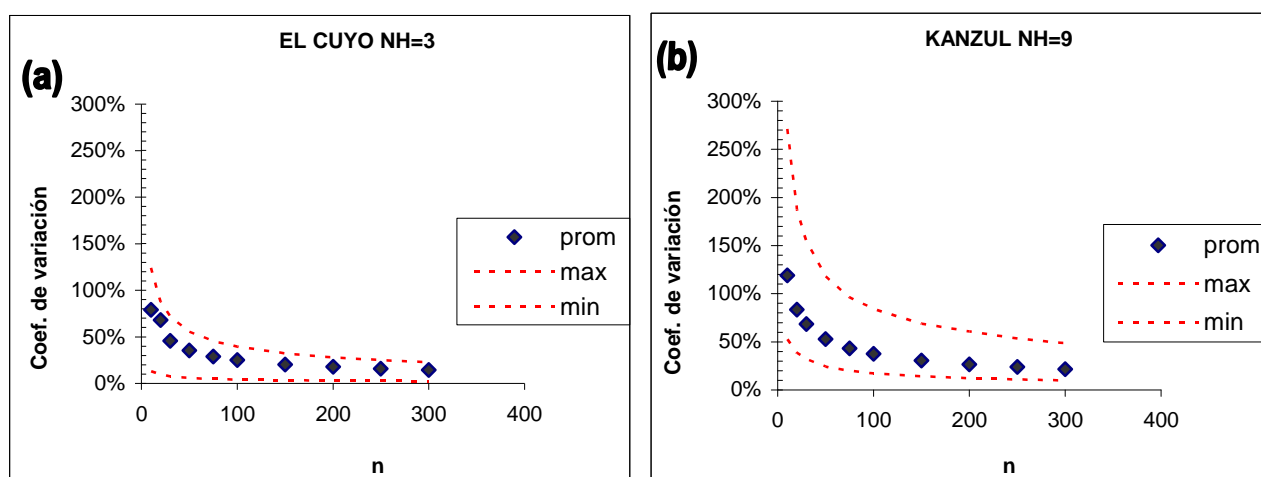


Figura 8.11. Cambios en el valor promedio de los coeficientes de variación para estimaciones de frecuencias haplotípicas por medio de 10,000 remuestros (a) para una composición como El Cuyo con 3 haplotipos uno de los cuales sea predominante y (b) para Kanzul con 9 haplotipos con frecuencias similares.

Los resultados anteriores ponen en duda la veracidad de la significancia de diferenciación entre poblaciones de muestreos en Quintana Roo con tamaños de muestra menores a 100 individuos. Esto es relevante ya que en varios de los análisis realizados (AMOVA's, pruebas de diferenciación genética entre otros), las colonias de Cozumel y Holbox (con los menores tamaños de muestra del estudio) muestran que estarían diferenciadas del resto de las poblaciones de Quintana Roo, a pesar de que los resultados de los programas de marcaje por programas de conservación usando grapas metálicas a fin de hacer seguimientos individuales indican la existencia (aunque en baja proporción) de hembras que



anidan en X'Caclal como en Holbox o en Cozumel (datos no publicados de Julio Zurita; Flora, Fauna y Cultura de México, A.C.).

Por las consideraciones anteriores se decidió tentativamente agrupar todas las colonias de Quintana Roo en una sola unidad de manejo hasta no obtener un número confiable de muestras de las poblaciones de Holbox y Cozumel. La agrupación anterior se muestra en la figura 8.12, junto con las demás colonias de la región Gran Caribe. Esta representación permite notar como las similitudes genéticas se relacionan con las frecuencias haplotípicas compartidas en la zona de estudio.

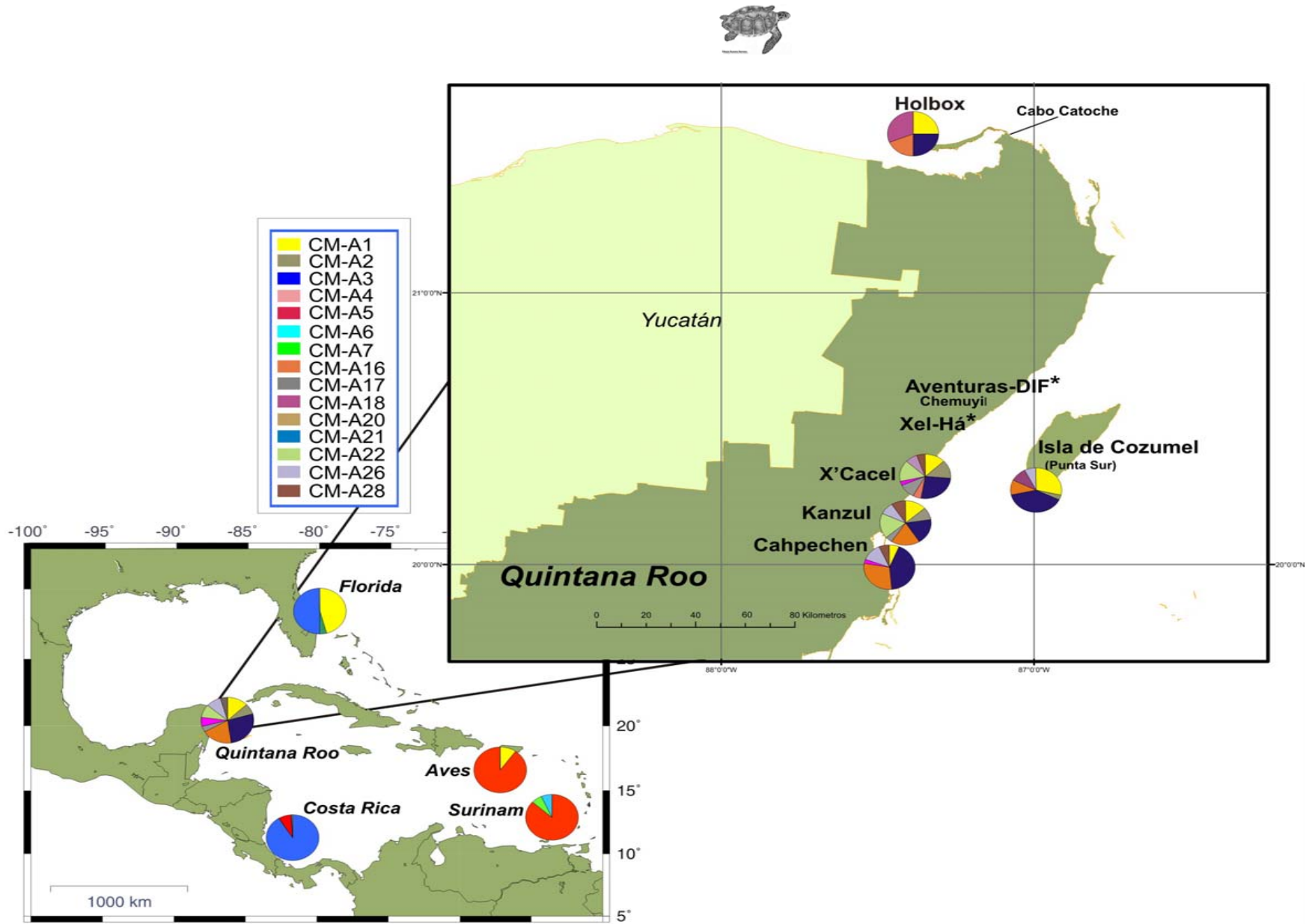


Figura 8.12. Distribución geográfica de los haplotipos observados y publicados en el Gan Caribe.

8.10. Contribución de colonias mexicanas a hábitats de alimentación en el Atlántico

Una parte importante de este trabajo es el estimar la contribución de las colonias evaluadas del Caribe mexicano a los distintos sitios de alimentación que se encuentran en el Atlántico, aprovechando información ya publicada sobre la composición haplotípica de cada agregación de tortugas. Para esta evaluación se aplicó un Análisis de Stocks Mezclados (MSA por sus siglas en inglés) que compara la composición de los sitios de mezcla con los perfiles haplotípicos de las poblaciones que pueden contribuir individuos (poblaciones fuente) para estimar la proporción más probable de contribución cada fuente a la mezcla (Pella y Milner 1987).

La información modificada de la composición de poblaciones de Quintana Roo con el nuevo muestreo con una cobertura más extensa permite incrementar la precisión de los resultados para estimar los niveles de presencia de tortugas de México en los hábitats marinos de la región y compara las nuevas estimaciones con las publicadas anteriormente, para evaluar cómo se modifican los niveles estimados de la contribución de las colonias de Quintana Roo.

Se reevaluaron las contribuciones por población de cuatro sitios de alimentación disponibles en la literatura que reportan por lo menos uno de los haplotipos observados en Quintana Roo. Se han estudiado ocho sitios de alimentación: Carolina del Norte (Bass *et al.* 2006), Florida (Bass y Witzell 2000), Bahamas (Lahanas *et al.* 1998), Barbados (Luke *et al.* 2004), Almofala y Ubatuba (Naro-Maciel *et al.* 2007), Nicaragua (Bass *et al.* 1998), Atolón de Rocas (Bjorndal *et al.* 2006), y los haplotipos detectados en las colonias analizadas en este estudio se encuentran presentes únicamente en cinco de éstos.

En la mayoría de los sitios, al incorporar los datos nuevos de las colonias de Quintana Roo se obtuvieron estimaciones que indican una mayor contribución que la que anteriormente se calculó. La contribución de esta UM varía entre sitios de alimentación, resultando un máximo de 20.4% en Carolina del Norte; y disminuyendo gradualmente en sitios más al sur (9% en Florida,) o más distantes (5.7% en Barbados, 1.2% en Almofala y menos del 1% en Nicaragua). En dos casos, la nueva estimación es menor de la que originalmente se publicó en Barbados (Tabla 8.12, 1) se registró 10.3% pero con los datos del presente trabajo (3) este disminuyó a 6%. Para las Bahamas, no era posible originalmente distinguir entre la contribución de Florida y Quintana Roo, y se estimaba una contribución combinada de 5%. Con la nueva información es posible separar la estimación de Florida de la de Quintana Roo y se obtiene una estimación de 0% para Quintana Roo, y el total de la porción originalmente compartida realmente pertenece a Florida (4.8%, Col 3).



Igual de importante es el hecho que al haber detectado haplotipos en Quintana Roo para los que anteriormente no se conocía su origen. Ahora, al realizar los análisis de stocks mezclados se incrementa la precisión de los resultados cuando la clase de haplotipos “sin origen conocido” se reduce considerablemente. Por ejemplo, tanto en los sitios de alimentación en Carolina del Norte como en Bahamas la categoría de “desconocidos” disminuyó considerablemente para el primer caso de 8% a 2.8% debido a la identificación de los haplotipos CM-A22, CM-A26, CM-A28. Algo similar ocurrió con el CM-A22 en Barbados por lo que para este sitio el origen de todos los haplotipos han sido determinados.

Estos resultados indican que, en general, las colonias del Caribe mexicano se alimentan primordialmente en hábitats localizados dentro del Gran Caribe. El patrón geográfico que emerge indicaría el importante papel de varias corrientes oceánicas (la del Caribe, de Florida, del Golfo y la nor-Ecuatorial) en el transporte de juveniles principalmente al Sureste de los Estados Unidos.



Tabla 8.12. Resultados del Análisis de Stocks Mezclados usando SPAM (ADGF [Alaska Department of Fish and Game] 2001; Debevec *et al.* 2000) para agregaciones marinas previamente estudiadas. En la columna 1 se copian los valores originales de cada estudio, en la 2 se reanalizan los datos incorporando información de perfiles haplotípicos recientes, pero sin incluir los de este estudio; en la 3 se incluyen los resultados con la información completa incorporando los resultados de este estudio para Quintana Roo. Los valores se expresan en % del estimado total. s/d = sin datos . En negritas se resaltan los sitios donde se registraron cambios importantes en el % de haplotipos sin origen.

		SITIOS DE ALIMENTACIÓN											
		Carolina del Norte ¹			Florida ²			Bahamas ³			Nicaragua ⁴		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
COLONIAS DE ANIDACIÓN	Florida	63.1	57.0	61.2	42.4	36.0	39.2	5.0	4.8	4.8	na	0.0	0.2
	Q. Roo	18.0	17.0	20.4		9.0	9.0		0.0	0.0	na	0.0	0.1
	Costa Rica	7.2	8.0	4.2	53.4	52.0	50.8	79.0	86.6	86.6	96.4	97.0	97.1
	Aves	4.5	3.0	4.7	4.2	0.0	1.0	14.0	6.1	6.1	3.6	3.0	2.7
	Surinam												
	I. Trinidad												
	A. Rocas	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0
	I. Ascensión	7.2			0.0								
	G. Bissau		7.0	6.6		0.0	0.0	1.0	1.3	1.3	sin datos	0.0	0.0
	I. Bioko	s/d			sin datos							0.0	0.0
	Santo Tome					0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0
Chipre	0.0		0.0										
% de organismos con haplotpos de orígenes desconocidos	s/d	8.0	2.8		2.0	0.0	s/d	1.3	1.3		0	0	
		Barbados ⁵			Almofala ⁶			A.Rocas ⁷			Ubatuba ⁸		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
COLONIAS DE ANIDACIÓN	Florida	18.5	20.0	22.1	0.2	0.0	0.0	sin datos	4.2	4.2	0.1	0.0	0.0
	Q. Roo	10.3	5.0	5.7	0.8	1.2	1.2		0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
	Costa Rica	19.1	24.0	22.6	15.4	15.6	15.6		0.0	0.0	0.3	1.0	1.0
	Aves				18.0			sin datos	22.0	22.0	13.1		
	Surinam				8.3	24.7	24.7		0.9			13.0	13.0
	I. Trinidad				6.4			sin datos	12.8	12.8	14.4		
	A. Rocas	1.1	3.0	4.6	3.0	5.6	5.6		3.2			11.0	12.0
	I. Ascensión	25.0			43.6			sin datos	69.0		53.6		
	G. Bissau	3.1			1.7				61.0	61.0	12.4		
	I. Bioko		25.0	23.8	2.3	51.3	51.3		1.5			74.0	73.2
	Santo Tome	s/d			0.4						0.4		
Chipre	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0		0.0	0.0	0.1	0.0	1.0	
% de organismos con Haplotpos de orígenes desconocidos	s/d	2.0	0.0	s/d	1.7	1.7			0.0	s/d	1.0	1.0	

Referencias :

- ¹ Bass *et al.* 2006
- ² Bass y Witzell 2000
- ³ Lahanas *et al.* 1998
- ⁴ Bass *et al.* 1998
- ⁵ Luke *et al.* 2004
- ⁶ Naro-Maciel *et al.* 2007
- ⁷ Bjorndal *et al.* 2006
- ⁸ Naro-Maciel *et al.* 2007

9. DISCUSIÓN

9.1. Composición haplotípica

En la generalidad de las poblaciones de la tortuga verde que se han estudiado en el Atlántico se detectan de dos a siete haplotipos (Encalada *et al.* 1996, Bjorndal *et al.* 2005, Formia *et al.* 2006). La excepción son las poblaciones de Isla Ascensión (Formia *et al.* 2007) y la de Quintana Roo, México en el estudio previo de Encalada *et al.* (1996) que presentan 13 y 7 haplotipos, respectivamente. Sin embargo, en todos los casos menos en Quintana Roo, uno o dos haplotipos de éstos concentran más del 80% de la frecuencia, mientras que el resto típicamente tienen bajas frecuencias e incluso se presentan en un solo individuo (Encalada *et al.* 1996, Bjorndal *et al.* 2005, Bjorndal *et al.* 2006, Formia *et al.* 2006, Formia *et al.* 2007). Este nuevo análisis de Quintana Roo, ahora con un tamaño de muestra más elevado (N= 213), confirma ambos factores: alto número de haplotipos (nueve) y con una distribución similar de las frecuencias haplotípicas.

En el estudio realizado por Encalada *et al.* (1996) con una muestra de N=20, observaron siete haplotipos pero en dos de ellos (CM-A5 y CM-A15) se presentó solamente un individuo. Curiosamente dichos haplotipos no se encontraron en este estudio a pesar de incrementar sustancialmente la cobertura geográfica del muestreo estatal y el tamaño de muestra. El primero de estos haplotipos ha sido reportado hacia el sur de Quintana Roo, en Costa Rica (Bjorndal *et al.* 2005) y en el extremo oriental del Gran Caribe, en Aves y Surinam (Encalada *et al.* 1996) en frecuencias relativamente altas. También se ha localizado en todos los sitios de alimentación estudiados hasta el momento (Encalada *et al.* 1996, Lahanas *et al.* 1998, Bass *et al.* 1998, Bass y Witzell 2000, Luke *et al.* 2004, Bass *et al.* 2006, Naro-Maciel *et al.* 2007). Por otro lado, el haplotipo CM-A15 únicamente fue observado en Quintana Roo en el estudio de Encalada y en el sitio de alimentación ubicado en Carolina del Norte (Bass *et al.* 2006) manifestándose solamente en un individuo en ambos casos.

En contraste, en el presente estudio se identificaron cuatro haplotipos que no habían sido observados en colonias de México: CM-A2, CM-A22, CM-A26 y CM-A28. Los tres últimos sólo habían sido reportados por Bass *et al.* (2006) en el sitio de alimentación ubicado en Carolina del Norte y el CM-A2 que ha sido reportado en un solo individuo en una colonia de anidación ubicada en Florida (Encalada *et al.*, 1996) y en sitios de alimentación de Florida y Carolina del Norte (Bass y Witzell 2000, Bass *et al.* 2006). El hallazgo de nuevos haplotipos es esperado cuando se incrementa sustancialmente el tamaño de la muestra (ej. Bjorndal *et al.* 2005). Lo que persiste como atípico, sin embargo, es la distribución tan similar de las frecuencias haplotípicas.

En la región del Gran Caribe (Florida hasta Costa Rica) se han detectado dos haplotipos comunes: el CM-A3 y el CM-A1. El primero predomina en la colonia más grande (Costa Rica) y no sorprende que la proporción se mantenga en sitios de agregación (Encalada *et al.* 1996, Lahanas *et al.* 1998, Bass *et al.* 1998, Bass y Witzell 2000, Luke *et al.* 2004, Bass *et al.* 2006, Naro-Maciel *et al.* 2007). Encalada y colaboradores (1996) reportan este mismo patrón y a pesar de que Quintana Roo pertenece al Gran Caribe, en el presente estudio se encontró que los haplotipos mejor representados son el CM-A3 y el CM-A16, abarcando 27 y 18% respectivamente de las muestras con el CM-A1 en tercer lugar de abundancia.

Con todo lo anterior se observó que un 66% de los haplotipos presentes en este estudio son endémicos de las costas del Caribe mexicano. Es decir, de los nueve haplotipos encontrados seis se encuentran únicamente en colonias de anidación localizadas en las costas de Quintana Roo.

El hecho de que los haplotipos CM-A5 y CM-A15 hayan sido observados por Encalada y colaboradores y no en este estudio a pesar de un incremento en el esfuerzo muestral 10 veces mayor no puede ser explicado de distintas maneras. La explicación más simple es que su abundancia fuera mucho más baja de la reportada por Encalada *et al.* (1996) y por debajo del nivel de detección del presente estudio. Otros escenarios más complejos incluyen (1) la posibilidad de que las hembras sean parte de una cohorte diferente que anidó en 1993, y las de 2005-2006 de nuestro muestreo y (2) dado que Encalada *et al.* usaron muestras de sangre de hembras anidando, podría reflejar eventos de pocas hembras “perdidas” (no residentes) cuya descendencia sea aun escasa por el lento crecimiento de las tortugas marinas o que no se hayan incorporado a la población reproductora. El primer caso, alusivo a variación temporal en frecuencias haplotípicas de colonias anidadoras, fue revisado por Bjørndal y Bolten (2008) y concluyeron que es poco probable y que no se ha observado en las tortugas marinas analizadas. El segundo caso no puede ser descartado con la información disponible, pero también es poco probable. De las tres explicaciones, la más probable es la primera y con incrementos en el tamaño de muestra en el futuro podría ser evaluada.

Con los nuevos oligonucleótidos se obtuvo una mejor resolución de la región control lo que permitió reconocer nuevos haplotipos a partir de nuevos sitios variables que permitió que dos haplotipos (CM-A1 y CM-A18) fueran divididos cada uno en dos haplotipos. De los dos pares, en la región estudiada solamente se detectaron el CM-A1.1, CM-A1.2 y el CM-A18.2. La utilidad de estas nuevas variantes aun no puede ser valorada efectivamente. Para ello se tendrá que esperar a que los oligonucleótidos sean más utilizados para mejorar la resolución de la estructura genética regional.

9.2. Diversidad genética intrapoblacional

La alta diversidad haplotípica de *C. mydas* ($h=0.801$) registrada en este estudio es consistente con los valores registrados en el estudio previo en parte de la misma zona, realizado por Encalada *et al.* (1996) ($h=0.816$). Esta diversidad es similar e incluso mayor que la que se presenta en sitios de alimentación (h_{\max} 0.7734, Barbados), donde normalmente existe una gran variabilidad de haplotipos ya que, en contraste con los sitios de anidación, convergen diversas poblaciones. Los valores obtenidos en este trabajo son de los más altos; las colonias del resto del Atlántico presentan una h que va desde 0.000 para Guinea Bissau en África (Encalada *et al.* 1996, Formia *et al.* 2006) hasta 0.580 en Santo Tomás, África (Formia *et al.* 2006). Lo mismo sucedió en la diversidad nucleotídica encontrada en Quintana Roo $\pi=0.0054$, mientras que en el resto de las colonias del Atlántico los valores fueron desde 0.0000 para Guinea Bissau (Encalada *et al.* 1996, Formia *et al.* 2006) hasta 0.0039 en Isla Aves (Encalada *et al.* 1996, Naro-Maciel *et al.* 2007).

En Quintana Roo, se encontraron valores altos para los dos parámetros, comparándolos con los resultados para colonias de tortuga verde. Esta condición se esperaría de una población extensa, antigua y estable en escalas de tiempo evolutivo (miles de generaciones) (Kimura 1980). Algunas de las colonias de África (Santo Tomás, Príncipe y Comoros) estudiadas por Formia *et al.* (2006) también presentaron altos valores de h y π , la primera alcanzando niveles similares a los de Quintana Roo y es interesante que al no poder asociar estos resultados con poblaciones grandes y estables (que no lo son), los autores prefieren resaltar la condición de insularidad de estas colonias y que, paralelamente, muestran un alto grado de endemismo. Isla Ascensión, colonia que se encuentra en medio del Atlántico, también presenta altos niveles de endemismo haplotípico (5 haplotipos endémicos de los 13 encontrados) y pocas hembras anidadoras por año (300-500 aprox.), pero presenta niveles de diversidad genética bajos ($h=0.299$, $\pi=0.0007$) (Formia *et al.* 2007). En el Atlántico la población con más hembras anidadoras es Costa Rica, entre 20,000-40,000 hembras por año, pero tiene niveles extremadamente bajos de diversidad haplotípica (Bjorndal *et al.*, 2005). La condición de endemismo haplotípico asociado con islas no se cumple plenamente en Quintana Roo ya que las colonias muestreadas son en parte continentales, y sólo Cozumel y Holbox son insulares y presenta tres haplotipos endémicos pero en baja frecuencia.

No obstante, la asociación de valores altos para h y π puede ser analizada desde otra perspectiva. Grant y Bowen (1998) compararon estos valores para un gran número de especies de peces marinos y presentan una interpretación que podría aplicar en nuestro caso. Mientras que manifiestan que la asociación entre valores altos en h como en π comúnmente

refleja poblaciones estables, grandes y con un prolongado historial evolutivo, también reconocen que el mismo resultado puede derivar de un contacto secundario entre linajes diferenciados. Con esta óptica, los valores encontrados en Quintana Roo podrían interpretarse como resultado de aportación genética de individuos provenientes de linajes regionales, a lo largo de la historia evolutiva reciente y que estos linajes se hayan perdido dado que la mayoría de los haplotipos de Quintana Roo no son observados en otras colonias. Una interpretación alternativa sigue siendo que el tamaño de la población de Quintana Roo fuera de tamaño mucho mayor que los actuales y los haplotipos detectables ahora son remanentes de un proceso de evolución local. No obstante, esta interpretación es hipotética ya que no se cuenta con información histórica sobre los tamaños de las poblaciones en el pasado, aunque se sabe que la sobreexplotación de las tortugas en décadas pasadas provocó serios desplomes en las poblaciones.

La interpretación de los valores altos de h y π , a partir de mezcla de linajes podría encontrar sustento en la ubicación de las costas de Quintana Roo con relación a la Corriente del Caribe. En este sistema oceanográfico convergen varias corrientes que enfocan su flujo sobre la costa de la Península de Yucatán, antes de ser desviado hacia la Florida. Las corrientes podrían facilitar el transporte de juveniles de diversas regiones con diferentes haplotipos y que, algunos se hayan establecido allí. A pesar de que la *Chelonia mydas*, presenta una de las conductas más filopátricas entre las especies de tortugas marinas (Carr *et al.* 1982), también es cierto que algunos pocos individuos modifican este comportamiento que se debe generalmente a cambios ambientales drásticos (Carr 1967). Es de esperarse que esto ocurra ocasionalmente dando lugar a nuevas colonizaciones. De hecho, esto debe ocurrir esporádicamente para lograr eventos de colonización de nuevos ambientes como evidentemente lo ha hecho.

9.3. Relaciones genealógicas entre secuencias

Usando el primer conjunto de secuencias del ADNmt de poblaciones de tortuga verde en el Atlántico, Encalada *et al.* (1996) propusieron un árbol de relaciones filogenéticas entre los haplotipos que sugiere dos linajes principales con fuertes asociaciones geográficas. Un linaje (A) para haplotipos de la zona Atlántico norte y occidental (Gran Caribe) junto con el Mediterráneo y un segundo (linaje B) comprendiendo secuencias del Atlántico sur. Propusieron igualmente un haplotipo “hipotético 1” como vínculo entre los dos linajes, el cual posteriormente se identificó como CM-A27 (Bjorndal *et al.* 2005) y un haplotipo “hipotético 2” que posteriormente en el trabajo realizado por Bjorndal *et al.* (2005) sería descartado.

Apoyándose en lo anterior estos autores proponen unir el CM-A18 con el CM-A1 lo que concuerda con los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo. Conforme a la red generada mediante el programa TCS, se plantea adjuntar el CM-A18, además del CM-A27, al linaje A por medio del haplotipo CM-A9. Según Encalada *et al.* (1996) la segregación geográfica de linajes dentro de la cuenca del Atlántico puede explicarse por fenómenos de dispersión, haciendo hincapié en la capacidad de los organismos para trasladarse y reestablecerse ocasionalmente más allá de los límites de su distribución al abrirse nuevos ambientes o hacia zonas con condiciones favorables después de períodos de glaciación en los últimos 10,000 años.

Los haplotipos de *C. mydas* encontrados en el desarrollo del presente trabajo se ubicaron exclusivamente en el linaje A (Gran Caribe) a diferencia de lo reportado por Encalada *et al.* (1996) quienes también identifican un haplotipo (un individuo), el CM-A5, proveniente del linaje B. Un haplotipo numeroso y que se localice en el centro de la red de haplotipos es considerado como el haplotipo ancestral (Templeton 2002). En el linaje B el haplotipo CM-A8 es el considerado como el ancestral debido a que en las colonias del Atlántico Sur es el de mayor abundancia (Encalada *et al.* 1996, Bjorndal *et al.* 2006, Formia *et al.* 2006; Formia *et al.* 2007). El haplotipo central en el esquema TCS para el linaje A es el CM-A3 (Encalada *et al.* 1996, Bjorndal *et al.* 2006, Naro-Maciel *et al.* 2007) por lo que es considerado como el ancestral. También es el más abundante en la región lo que coincide con los resultados aquí presentados que lo detectaron en una frecuencia global del 27%, seguido del haplotipo CM-A16 con 19% y en tercer lugar el CM-A1 con 13.6%. Estos valores contrastan con los resultados de Encalada *et al.* (1996), quienes encontraron que el haplotipo más abundante con un 29% fue el CM-A1, seguido por el CM-A3 con un 25%. Comparando nuestros resultados con los encontrados en Costa Rica el haplotipo CM-A3 también es el más abundante con un 91% (Bjorndal *et al.*, 2005) y en las colonias de Florida, los haplotipos CM-A1 y el CM-A3 se encontraron ambos aproximadamente en la misma frecuencia: 46% y 48%, respectivamente (Encalada *et al.*, 1996).

Los haplotipos del Mediterráneo, CM-A13 y CM-A14 reportados por Encalada *et al.* (1996) que también se ubican dentro del linaje del Gran Caribe (Fig. 8.2 y 8.3), aparecen cercanamente relacionados con haplotipos endémicos de Quintana Roo, (CM-A16 y CM-A17). La explicación de Encalada y colaboradores (1996) sigue siendo vigente y basada en la estrecha relación entre los haplotipos del Caribe y Chipre: que la colonización del Mediterráneo durante el presente período interglaciar surge a partir de precursores de estos haplotipos.

9.4. Diferenciación interpoblacional y unidades de manejo en el contexto regional

La conformación de las colonias del Caribe mexicano como grupo diferenciado dentro de la región del Atlántico fue confirmada plenamente con los estadísticos empleados (por ejemplo, $F_{ST} > 0.1$ respecto al resto del Caribe). Sin embargo, dado que la diferenciación interpoblacional dentro de Quintana Roo es pequeña y se manifiesta en haplotipos estrechamente relacionados, con pocos cambios entre sí, resultó difícil la interpretación de los resultados. Los resultados para los estadísticos F_{ST} y Φ_{ST} dentro de Quintana Roo sugieren una diferenciación entre las colonias insulares de Holbox y Cozumel, con respecto a las del centro del estado (X'cacel, Kanzul y Cahpechen). Sin embargo, varios factores y análisis adicionales (que son discutidos más adelante) nos condujeron a poner en duda el resultado de estructura genética dentro del estado. Adicionalmente a que fueron colonias con reducidos tamaños de muestra ($N < 30$), los programas locales de marca-recaptura (Eduardo Cuevas y Julio Zurita, sin publicar), sugieren que entre las colonias de Quintana Roo existe un pequeño intercambio de reproductores. Por lo tanto, para los fines del presente trabajo se optó por la interpretación más simple, aceptando la hipótesis nula de no-diferenciación entre las colonias insulares y las continentales de la zona estudiada.

No obstante, persiste una cercanía evolutiva con algunas de las colonias de la región congruente con los valores de flujo génico, Nm . Mientras que éstos son menores que 2 con respecto a Costa Rica (Tabla 8.9), con Florida tiende a ser más cercana (Nm alrededor de 3), particularmente en la comparación con Cozumel. La interpretación de este resultado en particular deberá esperar verificación con muestreos más numerosos para asegurar datos más confiables. Por el momento resulta poco probable que exista un flujo contemporáneo dentro de escalas cortas de tiempo (décadas) entre Florida y Cozumel, toda vez que no hay evidencias de intercambio de tortugas marcadas, a pesar de que en ambos sitios se han realizado programas de marca-recaptura durante varias décadas. En Australasia, Dethmers *et al.* (2006) demostraron que colonias con distancias menores a los 260 km entre ambas, no hay evidencia de un aislamiento por distancia, en cambio si la distancia geográfica es mayor a los 1,000 km si existe.

Las razones anteriores justificaron la agrupación de las colonias de Quintana Roo en una sola UM. Esto fue adicionalmente apoyado por los análisis de AMOVA, indicando que la población de Quintana Roo está estructurada genéticamente con respecto a las del resto del Atlántico, incluso con Florida. Esto fue congruente también con los resultados de la prueba de Mantel y coincide con los resultados de Dethmers *et al.* (2006) indicando que colonias separadas geográficamente por más de 2000 km presentan diferencias genéticas significativas.

En contraste con este resultado, Encalada *et al.* (1996) no detectaron estructuración genética significativa entre Florida y Quintana Roo, aunque su muestreo incluyó menos sitios y con un número substancialmente menor que el nuestro.

En el resto de las poblaciones del Atlántico, se definieron otras seis UMs, tres constituidas por una sola población y otras tres conformadas cada una por dos o más poblaciones. La primera de ellas conformada por la colonia de Florida que, como se mencionó anteriormente, parece no mostrar diferencias significativas con Cozumel, pero al agrupar Quintana Roo y hacer los análisis de diferenciación, los resultados muestran que aunque presentan un valor bajo de F_{ST} (0.101) y de Φ_{ST} (0.093) sí muestran diferencias significativas entre ellas ($p < 0.001$). También está el hecho de la distancia geográfica ya discutido anteriormente. La colonia de Tortuguero en Costa Rica es considerada otra UM, lo que concuerda con los resultados publicados por Encalada *et al.* 1996 y Bjorndal *et al.* 2005. La última UM constituida por una sola población es la de Chipre, conformada por haplotipos endémicos aunque relacionados evolutivamente con haplotipos de la región del Gran Caribe

Las demás UMs del Atlántico están formadas por varias colonias cada una. La primera de éstas quedó constituida por las poblaciones de isla Aves y Surinam cuyas pruebas de diferenciación realizadas con ambos métodos (F_{ST} y Φ_{ST}) no mostraron diferencias significativas. Tampoco las poblaciones de Brasil: Isla Trinidad y Atolón de Rocas (TIRA) se encuentran diferenciadas. Por último las colonias de África (isla Ascensión, Isla Bioko, Santo Tomás y Guinea Bissau) las cuales debido a los altos niveles de flujo génico a una composición haplotípica similar y a la cercanía que existe entre ellas, fueron consideradas como otra unidad de manejo.

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) permite evaluar cómo se distribuye la variación genética entre individuos y poblaciones, desglosándola entre diferentes niveles jerárquicos. Además de permitir la evaluación de agrupaciones de unidades demográficas identificadas en los procesos anteriores, facilitó analizar el comportamiento de los estadísticos del AMOVA usando los dos modelos más aplicados para estimar diferenciación genética: Φ_{ST} (basado en valores que incorporan datos sobre diferencias a nivel nucleótido) y F_{ST} convencional (basado en diferencias de frecuencias haplotípicas solamente). Los valores de diferenciación entre unidades poblacionales de regiones que contienen distintos linajes, el índice de variación entre regiones (Φ_{CT}) fue más alto que con F_{ST} convencional. Sin embargo, conforme realizamos comparaciones dentro de ámbitos geográficos más cercanos, las estimaciones con F_{ST} convencional son las mayores. También Dethmers *et al.* (2006) encontraron un patrón similar para la tortuga verde de Australasia. Cuando se evaluó el Φ_{CT}

entre la región total, el estadístico basado en distancias genéticas concentró mayor proporción de la variación que con el F_{ST} -convencional. Pero este patrón se invirtió al realizar el análisis dentro de regiones más pequeñas. Ambos resultados son congruentes con lo planteado por O'Corry-Crowe *et al.* (1997) y sugieren que el F_{ST} convencional puede ser más preciso para estimar niveles de subdivisión poblacional cuando se trata de haplotipos diferenciados por pocas sustituciones, como fue el caso en nuestro estudio.

El AMOVA confirmó que las colonias de Quintana Roo muestran diferencias con las del Atlántico. Sin embargo los resultados de las colonias más cercanas a Quintana Roo, mostraron algunas ambigüedades. Todas las agrupaciones de las colonias de Quintana Roo con Costa Rica resultaron artificiales (P para Φ_{CT} n.s.). Sin embargo, las agrupaciones de X'cabel-Kanzul-Cahpechen y de Florida con Holbox-Cozumel o separada de las colonias insulares, resultaron significativas (P para $\Phi_{CT} < 0.05$). Tomando en cuenta los resultados del análisis de rarefacción, los AMOVA reflejaron ambigüedades en las evaluaciones que involucran a Holbox y Cozumel y que consideramos son abordados con los análisis del proceso de muestreo más adelante. Sin embargo, la agrupación de las poblaciones quintanarroenses resultó ser apoyada por la prueba de significancia ($P < 0.05$) y respalda la formación de este grupo como una Unidad de Manejo.

9.6. Aislamiento por distancia

En una especie filopátrica se espera encontrar un patrón de aislamiento por distancia (Bourjea *et al.* 2006). Cuando se analizaron las poblaciones del Gran Caribe, los resultados muestran una asociación positiva entre las matrices de distancia genética y la distancia geográfica ($r^2=0.36$, $p=0.001$). Sin embargo no hubo relación entre distancias genéticas y geográficas en un ámbito geográfico más limitado, como en el que se encuentran las colonias de Quintana Roo ($r^2<0.01$, $p=0.58$). Este patrón es consistente con el encontrado en colonias del Océano Índico por Bourjea *et al.* (2006), quienes encontraron una correlación significativa ($r^2=0.35$, $p<0.001$) entre las distancias cuando incluyen todas las colonias y al quitar colonias del Canal sur de Mozambique (Europa y Juan de Nova) no encuentran ninguna correlación entre los valores de distancia genética y geográfica ($r^2=0.0018$, $p=0.147$). La mayoría de las hembras migran menos de 1,000 km entre las colonias de anidación y el hábitat de alimentación, aunque se han registrado distancias superiores a 2,600 km (Miller 1997). Estas observaciones indican que la distancia que hay entre las colonias del Caribe mexicano no representa una barrera efectiva. Otro ejemplo de este patrón de dispersión es el que se presenta en las colonias de Australasia (Dethmers *et al.* 2006) cuya correlación entre las

matrices de distancia genética y distancia geográfica entre las colonias (poblaciones separadas por más de 2,000 km) ($r^2=0.06$, $p=0.011$), analizadas mediante la prueba de Mantel, fue positiva, aunque cuando se realizaron en colonias separadas por menos de 2,000 km, mostraron mayor correlación ($r^2=0.12$, $p<0.001$). Se puede esperar que las poblaciones de *C. mydas* separadas por distancias menores a los 1,000 km no exista una correlación entre las distancias genéticas y las geográficas, pero sí la mostrarán cuando se trate de poblaciones alejadas por más de 1,000 y 2,000 km. En distancias mayores pierde valor la correlación.

9.7. Efectos de muestreo

La caracterización genética rigurosa y confiable de las poblaciones es un requerimiento central en todos los estudios de genética de poblaciones, como el presente. Sin embargo, es necesario evaluar la relación costo-beneficios de lograr un muestreo exhaustivo que incluya todas las variantes presentes en las poblaciones. Las composiciones haplotípicas más comunes (uno o dos haplotipos comunes, con varios otros en menor frecuencia, algunos únicos) generalmente requieren incrementar considerablemente el esfuerzo de muestreo para acercarse al número de haplotipos máximo estimado (S_{max}). Por ejemplo, tanto para la población de Tortuguero como para la de Isla Ascensión se demostró que para obtener el número asintótico de haplotipos se requieren tamaños de muestra de cientos o miles de organismos (Fig. 8.8). Para Ascensión se observaron 13 haplotipos con un tamaño de muestra de 245 que apenas representa un 72% del número total de haplotipos que se estimó en 18. Basándose en una extrapolación, Formia *et al.* (2007) mencionan que para obtener un 83% (15 haplotipos) de la variación se necesitarían 430 muestras y para un 94% (17 haplotipos) requeriría 1,384 muestras. En Tortuguero se han observado 5 haplotipos con 433 muestras, (apenas un 83% del número total estimado) con un número máximo de haplotipos (S_{max}) alrededor de 6. Para alcanzar este valor con certeza se estima se requieren 729 muestras (Formia *et al.* 2007).

La pregunta obligada es si vale la pena el incremento en esfuerzo y costo de análisis para obtener los escasos incrementos en resolución. Formia *et al.* (2007) argumenta a favor de usar tamaños grandes para detectar la mayor cantidad de variabilidad, ya que les preocupaba la uniformidad genética presente entre poblaciones distantes y, de allí, la necesidad de evaluar el efecto de diferentes tamaños de muestra en los análisis. Finalmente, dado que no existen criterios fijos que dicten la relación entre el esfuerzo de muestreo y la diversidad observable, sugieren que dependiendo de los propósitos el estudio y de las características de composición genética de las poblaciones objeto de estudio, se apliquen herramientas analíticas como el

análisis de rarefacción para evaluar la relación entre esfuerzo de muestreo y la capacidad de detección de la variación genética.

Dado que el enfoque del presente trabajo es la adecuada caracterización de la constitución genética de las poblaciones de tortuga verde en el Caribe mexicano para lograr evaluaciones estadísticamente confiables del grado de diferenciación entre poblaciones la problemática expuesta por Formia *et al.* (2007) es relevante y se aplicaron metodologías similares para esclarecer el efecto del esfuerzo de muestreo (número de muestras).

En la medida de que los análisis de rarefacción sugieren que si bien en el muestreo global se usó un número de muestra lo suficientemente grande como para garantizar una detección de más del 95% de la variación total esperada, el margen restante de variación oculta incluye la posibilidad de que los dos haplotipos no encontrados por Encalada *et al.* (1996) sí existan, aunque tendrían que estarlo a frecuencias menores de las originalmente reportadas. La capacidad para lograr detectar este alto porcentaje de la variación estimada por rarefacción con un número relativamente pequeño contrasta ampliamente con lo determinado para Tortuguero o Isla Ascensión (Formia *et al.* 2007 y este estudio).

Sin embargo, el elemento más crítico de este proyecto es el efecto de las variaciones en el esfuerzo de muestreo sobre la precisión en la determinación de la composición genética. Mientras que a Formia *et al.* (2007) consideraron que pequeños tamaños de muestra podrían enmascarar la diferenciación genética real entre poblaciones distantes geográficamente, en nuestro caso encontramos lo opuesto, diferencias significativas entre poblaciones con pocas muestras. Mientras que Formia y colegas encontraron que en sus casos, cuando incrementaron los tamaños de muestra, los índices de diferenciación interpoblacional también lo hicieron, nuestro caso es el opuesto, que con pequeños tamaños de muestra, poblaciones no diferenciadas aparecen menor número de haplotipos y con frecuencias haplotípicas distorsionadas por efectos del muestreo, dando por resultado significatividad artificial.

La primera conclusión del análisis de rarefacción es que los pequeños tamaños de muestra de poblaciones aparentemente diferenciadas no pueden garantizar que se haya observado una proporción adecuada de la variación existente. Esta distorsión afectaría los resultados de los análisis de diferenciación, aunque depende mucho de la distribución de las frecuencias de los haplotipos involucrados. Para perfiles típicos de uno o dos haplotipos dominantes, con otras variantes de bajas frecuencias, la limitación en detección de la variación completa afecta muy poco en las comparaciones entre poblaciones (ver p. ej. Bjørndal *et al.* 2005). Sin embargo, en el caso de Quintana Roo que atípicamente contiene una

gran cantidad de haplotipos y varios con frecuencias relativamente altas, se espera que el impacto sea mucho mayor.

Si bien los análisis de rarefacción indican que las colonias escasamente muestreadas probablemente contienen un mayor número de haplotipos que los detectados, necesitamos demostrar si el tamaño de muestra también afecta la precisión de las estimaciones de frecuencias. Esta evaluación innovadora indica claramente (sección 8.9) que el margen de error en las estimaciones de frecuencias haplotípicas es mucho más amplio en poblaciones con perfiles haplotípicos como el del presente trabajo que en los típicos con un haplotipo dominante y dos o más en baja frecuencia. Este incremento de los márgenes de error se acentúa adicionalmente en tamaños de muestra pequeños ($N < 100$).

Considerando el conjunto de los resultados de (1) rarefacción que sugieren que el número de haplotipos observados en las poblaciones con pequeños tamaños de muestra (HB, CZ, CP) está subestimado y (2) el coeficiente de variación para las estimaciones de frecuencias que indica un incremento en los errores de precisión para frecuencias haplotípicas con tamaños de muestras menores a 100, la conclusión más lógica es que el resultado de una diferenciación significativa entre HB y CZ y las demás colonias del estado representan falsos positivos. Esta reconsideración del resultado estadístico, indica en su lugar la presencia de una sola unidad de manejo en las colonias de tortuga verde en el Caribe mexicano. No obstante esta conclusión depende de varios supuestos por lo que resulta indispensable a futuro recomendar que se realicen muestreos adicionales con mayor cobertura en las poblaciones insulares para verificar las hipótesis aquí planteadas.

9.8. Contribución de colonias mexicanas a hábitat de alimentación en el Atlántico

Poco se conoce sobre las migraciones de los juveniles de la especie, pero incluyen varios años en la zona pelágica (Carr 1987; Musick y Limpus 1997), seguido por un reclutamiento hacia hábitats neríticos (Hirth 1997). Mientras que el uso de marcas físicas han permitido conocer los patrones migratorios de los adultos, ya que a ellos se les puede identificar y dar seguimiento con relativa facilidad (Hirth 1997), los derroteros y ubicación de los hábitats intermedios de desarrollo para las fases iniciales se han apoyado primordialmente en el uso de marcas moleculares que identifican las unidades demográficas en sitios de agregación marina (Bowen y Avise 1995). Con estos análisis (Broderick *et al.* 1994) se ha iniciado el esclarecimiento de los patrones de dispersión a través de las cuencas oceánicas y se ha comenzado a comprender de cómo interactúan diversos fenómenos externos (patrones y

fuerza de corrientes, distancias entre sitios de anidación o natalidad y de alimentación) e intrínsecos (filopatría) para definir contribuciones de las distintas colonias fuentes a las mezclas donde convergen individuos de diferentes colonias (Broderick *et al.* 1994; Bolten *et al.* 1998; Lahanas *et al.* 1998; Bass y Witzell 2000). Se ha considerado que los patrones de las contribuciones están en función directa del tamaño de la colonia (Lahanas *et al.* 1998; Bass *et al.* 1998), pero también se ha demostrado que está influenciada por las distancias entre la colonia y el sitio de agregación (Bass y Witzell 2000), la filopatría y las corrientes oceánicas (Luke *et al.* 2004; Bass *et al.* 2006). La importancia de conocer la ubicación y la composición poblacional de los sitios de alimentación adquiere mayor relevancia al conocerse que las tortugas marinas no solo muestran fidelidad al sitio de anidación si no también a donde se alimentan (Carr *et al.* 1978; Limpus *et al.* 1992).

Los análisis genéticos realizados en *C. mydas* en el Caribe mexicano permiten profundizar en el conocimiento de su distribución geográfica en diferentes estadios de vida. La detección de la existencia de tres haplotipos endémicos de Quintana Roo (CM-A22, CM-A26, CM-A28) que anteriormente sólo se conocían en sitios de alimentación permiten ubicar individuos de esta población y evaluar su contribución a hábitats regionales. Así, hubo incrementos en la estimación de la contribución de las colonias de Quintana Roo a cinco de los sitios de alimentación:

- En Carolina del Norte de 17.0% (datos de Bass *et al.* 2006 haciendo un re-análisis) a 20.4 % y disminuye la categoría de desconocidos de 8% a un 2.8%, representado por dos haplotipos (CM-A15 y CM-A27).
- Florida queda con un 9% en ambas ocasiones aunque el haplotipo CM-A22 fue identificado como originario de las colonias del Caribe mexicano, reduciéndose a 0% los “desconocidos”.
- En Barbados con la identificación del haplotipo desconocido (CM-A22) hubo un incremento de 0.7%, quedando un 5.7% final.
- En Nicaragua y Almofala, no se detectaron haplotipos “de origen desconocido” y el porcentaje de contribución de las colonias del Caribe mexicano fue muy bajo: 1% y 1.2% respectivamente.
- En las Bahamas, Atolón de Rocas y Ubatuba, no se encontró contribución por parte de las colonias del Caribe mexicano.

Bass y Witzell (2000) mencionan que las contribuciones a los sitios de alimentación se pudieran explicar por la tendencia de las tortugas a moverse a los sitios de alimentación cercanos a las playas donde nacieron una vez que estas alcanzan la madurez. Esto podría

explicar por qué en Carolina del Norte se encontró una mayor contribución de colonias cercanas, en primer lugar de la colonia de Florida (61%) seguido de Quintana Roo (20%). Sin embargo en el sitio de agregación marina de Florida se encontró que la principal contribución proviene de Costa Rica (51%) (colonia con un gran número de hembras anidantes), mientras que las colonias de Florida y Quintana Roo, siendo más cercanas, contribuyen en menor proporción (39% y 9%, resp.).

Los resultados obtenidos son de mucha utilidad para el diseño y adecuación de las estrategias y políticas de manejo para la especie, que requiere una visión regional dada la extensión geográfica y niveles de la presencia de poblaciones mexicanas en diversos hábitats. Aun así, aún no contamos con un conocimiento pleno del efecto de todos los factores que definen los patrones de dispersión espacial de las poblaciones. Todos los fenómenos postulados hasta ahora podrían aplicar para explicar los niveles y sitios en donde las colonias de Quintana Roo contribuyen significativamente; patrones de corrientes y distancias entre las colonias y los sumideros (Luke *et al.* 2004; Bass *et al.* 2006), además de un efecto proporcional al tamaño de las colonias como en el caso del sitio localizado frente a Florida, donde se observó que las poblaciones más grandes fueron quienes contribuían en una mayor proporción (Bolker *et al.* 2007)

9.9. Las Corrientes marinas como facilitadoras de procesos evolutivos

No es inesperado que los patrones de corrientes oceánicas concuerden con los resultados del seguimiento por marcadores moleculares. Varios derroteros de corrientes regionales podrían estar involucrados en el transporte de las primeras fases de desarrollo de la tortuga verde que nace en Quintana Roo. Uno de ellos resultaría de un acarreo por la corriente del Caribe que penetra en el Canal de Yucatán antes de entrar al Golfo y cruzar los estrechos de Florida para convertirse en la Corriente de Florida. (Appeldoorn *et al.* 1987; Smith *et al.* 2002). La Corriente de Florida y la de las Antillas se juntan y forman la corriente del Golfo (Gulf Stream), dirigiéndose hacia el norte pasando por Carolina del Norte (Wust 1964; Salazar-Vallejo 2000; Stevenson, 1981; Smith *et al.*, 2002). Esta vía explicaría la presencia de tortuga verde de Quintana Roo en los dos sitios de alimentación con los valores más altos de su contribución, Carolina del Norte (20%) y Florida (9%) (Fig. 9.1). Por otro lado, se conoce que algunas tortugas pueden ser transportadas mayores distancias si caen dentro del flujo de la corriente del Golfo (Fig. 9.2). La tortuga caguama puede ser transportada así a hábitats de alimentación a las orillas del Atlántico oriental (Bolten *et al.* 1998), lo mismo sucede con crías de tortuga verde. Un transporte de este tipo de la tortuga verde podría ser

más prolongado, y abarcar un circuito completo de la corriente del Golfo, hasta llegar a la corriente Nor-ecuatorial (Fig. 9.1). Dado que ésta converge con la de la Guyana justamente en las cercanías de Barbados, este prolongado circuito podría explicar la presencia relativamente alta (6%) en un sitio tan distante como las aguas de esa isla, o en su caso, la escasa presencia de individuos de Quintana Roo en la isla de Almofala en aguas Brasileñas.

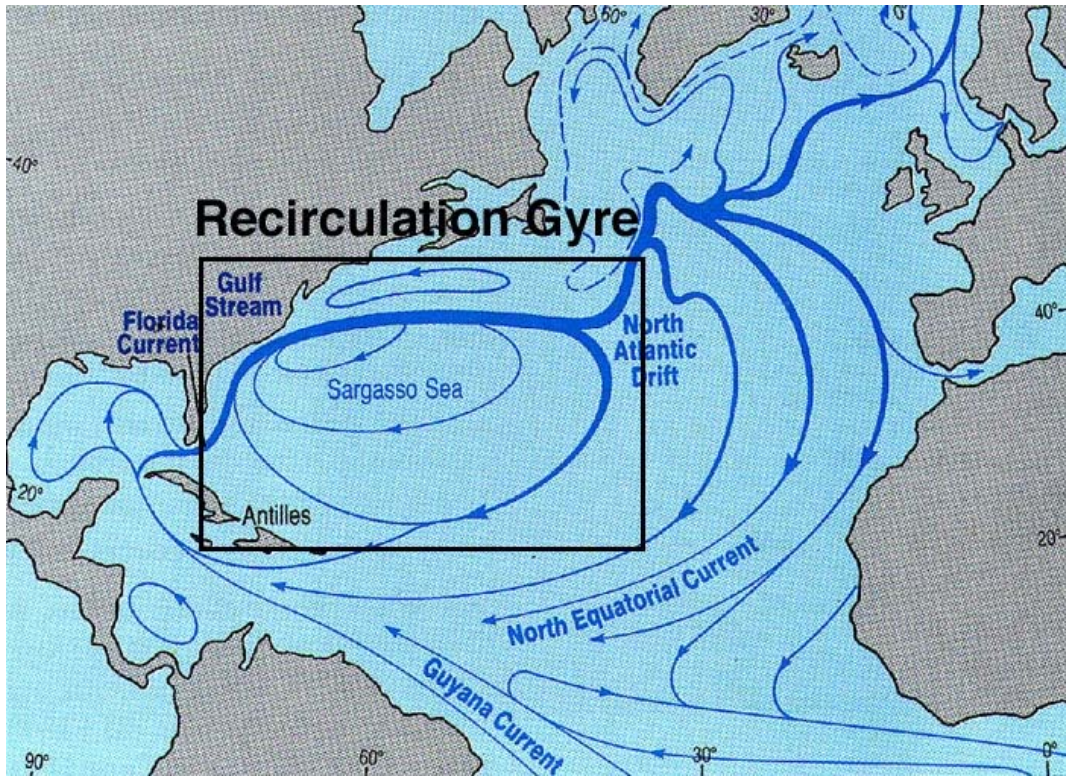


Figura 9.1. Patrón de corrientes oceanográficas de Atlántico que se sabe pueden estar involucradas en el transporte de tortugas marinas principalmente en etapas tempranas de desarrollo. (imagen tomada de <http://kingfish.coastal.edu/marine/gulfstream/p2.htm>)

El patrón de corrientes que recorren las costas de Quintana Roo podría ser la fuente de la altísima diversidad genética detectada en las colonias de tortuga verde de este estado (Fig. 9.2). Las corrientes que convergen y posteriormente se convierten en la del Caribe atraviesan por las aguas territoriales de una gran cantidad de sitios donde actualmente ocurren anidaciones de tortuga verde. Las corrientes podrían involucrar que el transporte de tortugas por la corriente del Caribe lleguen a las costas de Quintana Roo, y una vez ahí estarían a merced de las pequeñas corrientes que existen en estas costas (Fig. 9.2). Merino (1984) encontró que en zonas cóncavas inmediatas hacia el norte de las puntas y en las ensenadas, el fuerte flujo en dirección paralela a la costa puede generar gradientes negativos de depresión y provocando la formación de giros entre puntas consecutivas. En Quintana Roo existen varias zonas de este tipo, una de ellas esta localizada en las playas de Cahpechen, X'Caclé y Kanzul. Por este motivo se cree que cuando las tortugas entraron en zonas de este tipo algunas de las

que quedaran atrapadas podrían haberse establecido, contribuyendo con nuevas variantes genéticas propias de linajes foráneos.

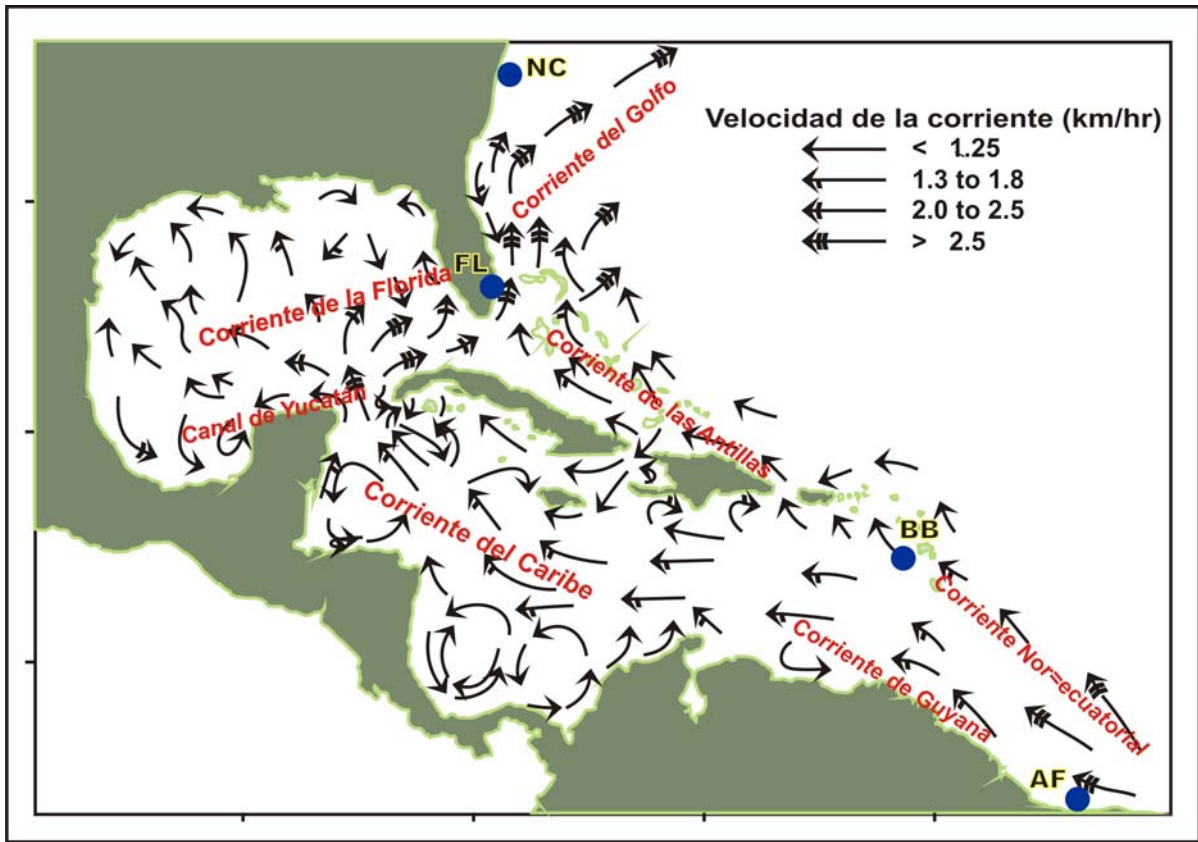


Figura 9.2. Patrón de corrientes oceanográficas que confluyen en el Caribe mexicano, indicando su dirección y velocidad. Los círculos denotan los principales sitios de alimentación detectados para las colonias de Quintana Roo por medio de análisis de stocks mezclados; NC= Carolina del Norte, FL=Florida, BB=Barbados, AF=Almofala.

10. CONCLUSIONES

10.1. Composición haplotípica de las colonias

- ❖ Se detectó un número atípicamente alto de haplotipos (un total de 9) para tortuga verde, con frecuencias haplotípicas muy homogéneas.
- ❖ De los nueve haplotipos, cinco habían sido reportados previamente en colonias de anidación (cinco en un análisis previo en el Caribe mexicano por Encalada *et al.* 1996), uno en la colonia de Florida y tres sólo se conocían de sitios de agregación marina sin origen asignable.
- ❖ Se reportan por primera vez para playas de Quintana Roo los haplotipos: CM-A2, CM-A22, CM-A26 y CM-A28.
- ❖ Los haplotipos que predominaron fue el CM-A3 (27%) y el CM-A16 (19%).
- ❖ Los haplotipos CM-A5 y CM-A15 reportados por Encalada *et al.* (1996) de Quintana Roo, aunque en baja frecuencia (1 individuo para cada haplotipo), no fueron observados en este estudio.
- ❖ El uso de los nuevos oligonucleótidos (LCM15382 y H950g) permitió identificar un nuevo sitio polimórfico en la posición 629 posterior al inicio de la región control en el haplotipo CM-A1, dividiéndose en CM-A1.1 y CM-A1.2. El haplotipo CM-A18 dio lugar a CM-A18.1 y A18.2. De los cuatro nuevos, el único que no se detectó en el presente estudio fue el CM-A18.1, detectado en un trabajo paralelo (O. Millán, datos no publicados)

10.2. Niveles de diversidad genética (h y π)

- ❖ En todas las colonias estudiadas se observaron simultáneamente valores de los más altos de h (> 0.7) y π (> 0.003) en comparación con las demás poblaciones estudiadas de la especie en el Atlántico.
- ❖ Este resultado probablemente refleja un contacto secundario o introgresión a partir de linajes diferenciados.

10.3. Red de haplotipos

- ❖ Al elaborar la red más parsimoniosa para los haplotipos de la especie en el Atlántico se identificaron dos grandes linajes conteniendo haplotipos con escasas diferencias entre sí (principalmente 1-2 diferencias). Uno (linaje B) agrupando los haplotipos de las poblaciones del Atlántico Sur y Centro, el otro (linaje A) conteniendo los del Gran Caribe

y Mediterráneo donde se localizaron todos los haplotipos que en este estudio se observaron.

10.4. Efectos de muestreo

- ❖ Un análisis de rarefacción indica que el tamaño global del muestreo en Quintana Roo (N=213) se logro detectar más del 95% de las variantes haplotípicas presentes.
- ❖ Sin embargo, los análisis de los efectos del esfuerzo de muestreo sobre la confiabilidad de la detección de variantes genéticas en tres poblaciones con tamaños de muestras menores a 50 (Holbox, Cozumel y Cahpechen) sugiere que éstos no están diferenciados del resto de las poblaciones en la localidad.

10.5. Estructura poblacional

- ❖ Las pruebas de F_{ST} confirmaron un alto grado de independencia reproductiva de la población de Quintana Roo en el contexto del Gran Caribe (Φ_{CT} AMOVA > 32, $P < .05$) y con respecto al resto de las poblaciones del Atlántico ($F_{ST} > 0.3$, $P < .01$).
- ❖ Los resultados interpoblacionales de los estadísticos F_{ST} y Φ_{ST} indicarían un agrupamiento entre las colonias de las dos islas (Holbox y Cozumel) y otro entre las colonias continentales (X'cacel, Kanzul y Cahpechen). Sin embargo, los errores en la precisión provocados por los efectos del tamaño de muestra para Holbox y Cozumel dentro de un contexto de un altísimo número de haplotipos con frecuencias similares, evidencia de intercambio entre estos dos grupos de colonias detectado por programas de marca-recaptura y niveles estimados de flujo génico interpoblacional (Nm) de > 5 por generación implican que el conjunto de todas las colonias del Caribe mexicano conforman una sola UM.

10.6. Aislamiento por distancia

- ❖ No se encontró un patrón de aislamiento por distancia en las poblaciones dentro del Caribe mexicano con las separaciones menores a 250 km ($P=0.58$). En cambio, cuando se incorporaron poblaciones de la región del Gran Caribe con separaciones de más de 1,150 km la relación fue significativa ($R^2= 0.3571$; $P =0.001$).

10.7. Contribución de las colonias del Caribe mexicano a sitios de alimentación en el Atlántico

- ❖ Se estimó que la población de *Chelonia mydas* que anida en Quintana Roo contribuye en una proporción importante a por lo menos tres de las ocho zonas de alimentación estudiadas en el Atlántico y en otras dos presenta una contribución relativamente baja e insignificante.
- ❖ Las mayores contribuciones relativas de la población de Quintana Roo son a los sitios de alimentación de la región más cercanos (Carolina del Norte con 20%, Florida con 9%) aunque también a uno mucho más distante (Barbados con 6%).
- ❖ Una contribución de relevancia del presente estudio fue la identificación del origen para varios haplotipos anteriormente solo reportados para sitios de alimentación. Con esta información se disminuyó el porcentaje de haplotipos no asignables en los análisis de stocks mezclados. Por ejemplo en el sitio de alimentación de Carolina del Norte se desconocía el origen de cuatro haplotipos y tres de ellos (CM-A22, CM-A26 y CM-A28) fueron encontrados en nuestras muestras de colonias quintanaroenses. En los sitios de Barbados y Florida todos los haplotipos para los que anteriormente se desconocían su origen fueron encontrados en nuestro muestreo.
- ❖ La distribución y niveles de contribución de la población del Caribe mexicano a los sitios de alimentación aparentemente dependen principalmente de: a) los derroteros de las corrientes oceanográficas y b) los tamaños de las poblaciones fuente.

11. RECOMENDACIONES

- Incrementar el tamaño de muestra principalmente para las playas de Holbox y Cozumel donde hubo ambigüedades en nuestros análisis.
- Secuenciar las muestras de las colonias de Chemuyil y Xel-Ha, así como también, aumentar el tamaño muestral.
- Aplicar el uso de loci microsatelitales para estudiar el flujo mediado por los machos y compararlo con los resultados de loci mitocondriales.
- Realizar comparaciones con colonias de la especie en el Golfo de México, para completar la identificación de los stocks en hábitats mexicanos.

12. BIBLIOGRAFIA

- Abreu-Grobois, F. A., A. L. Bass, R. Briseño-Dueñas, P. H. Dutton, S. E. Encalada, y N. N. FitzSimmons. 1996. Mitochondrial DNA D-loop sequences of marine turtles 147-162. En: Bowen, B.W. y W.N. Witzell (eds.) Proceedings of the International symposium on sea turtle conservation genetics. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC pp 173.
- Abreu-Grobois, F. A., J. A. Horrocks, A. Formia, R. LeRoux, X. Velez-Zuazo, P. Dutton. L. Solares, P. Meyland y D. Browne. 2006. New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analyses. Poster presented at the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Crete, Greece, 2-8 April 2006. Available from <http://www.iucnmtsg.org/genetics/meth/primers/abreu_grobois_etal_new_dloop_primers.pdf>
- Aijinabi, S. M. e I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 22:4692-4693p.
- Alaska Department of Fish and Game. 2001. SPAM Version 3.7: Statistics Program for Analyzing Mixtures. Alaska Department of Fish and Game, Commercial Fisheries Division, Gene Conservation Lab. Available for download from <http://www.cf.adfg.state.ak.us/geninfo/research/genetics/Software/SpamPage.htm>
- Allard, M. W., M. M. Miyamoto, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten y B. W. Bowen. 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences *Copeia*. 1994: 34-41.
- Amos, B. y A. R. Hoelzel. 1991. Long term preservation of whale skin for DNA analysis. *Rep. Int. Whal. Comm.* (special issue 13): 99-103.
- Appeldoorn, R., G.D. Dennis, y O. M. López. 1987. Review of shared demersal resources of Puerto Rico and Lesser Antilles Region. *En FAO Informes de pesca*, N° 383: 36-106.
- Balaz, G. H. 1995. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian Archipelago. In: *Biology and Conservation of Sea Turtles* (ed. Bjorndal K. A.), pp. 117-125. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Bass, A., D. A. Good, K. A. Bjorndal, J. I. Richardson, Z. M. Hillis, J. A. Horrocks y B. W. Bowen. 1996. Testing models of female reproductive migratory behaviour and populations structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Molecular Ecology* 5: 321-328.

- Bass, A. L., C. J. Lagueux y B. W. Bowen. 1998. Origin of Green Turtles (*Chelonia mydas*) at Sleeping Rocks” off the Northeast Coast of Nicaragua. *Copeia*. 1998:1064-1069.
- Bass, A. y W. Witzell. 2000. Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. *Herpetologia* 56:357–367.
- Bass, A. L., S. Epperly y J. Braun-McNeill. 2006. Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. *Journal of heredity*. 97(4):346–354.
- Bjorndal, K. y A. Bolten. 2008. Annual variation in source contributions to a mixed stock: implications for quantifying connectivity. *Molecular Ecology*. 17(9):2185-2193.
- Bjorndal, K., A. Bolten y S. Troëng. 2005. Population structure and genetic diversity in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology*. 147: 1449-1457.
- Bjorndal, K., A. Bolten, L. Moreira, C. Bellini y A. Marcovaldi. 2006. Population Structure and Diversity of Brazilian Green Turtle Rookeries Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Chelonian Conservation and Biology*. 5:261-268
- Bolker, B. M., T. Okuyama, K. A. Bjorndal y A. Bolten. 2007. Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: ‘many-to-many’ analyses. *Molecular ecology*. 16: 685-695.
- Bolten, A.B., J.A. Wetherall, G.H. Balazs, y S.G. Pooley (comps.). 1996. Status of marine turtles in the Pacific Ocean relevant to incidental take in the Hawaii-based pelagic longline fishery. U.S. Dept. Commer. NOAA Tech. Memo., NOAA-TM-NMFS-SWFSC-230.
- Bolten, A. B., K. A. Bjorndal, H. R. Martins, T. Dellinger, M. J. Bischoff, S. E. Encalada y B. W. Bowen. 1998. Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecological Applications*. 8:1-7.
- Bonhomme, F., S. Salvido, A. LeBeau, y G. Pasteur. 1987. Comparaison genetique de tortues vertes (*Chelonia mydas*) des Oceans Atlantique, Indien et Pacifique: une illustration apparente de la theorie mullerienne classique de la structure genetique des populations? *Genetica* 74:89-94.
- Bouchard, S. S. y K. A. Bjorndal. 2000. Sea turtles as biological transporters of nutrients and energy from marine to terrestrial ecosystems. *Ecology*. 81:81

- Bourjea, J., S. Lapègue, L. Gagnevin, D. Broderick, J. A. Mortimer, S. Ciccione, D. Roos, C. Taquet y H. Grizel. 2006. Phylogeography of green turtle (*Chelonia mydas*), in the Southwest Indian Ocean. *Molecular Ecology*.
- Bowen, B.W. y J.C. Avise. 1995. Conservation genetics of marine turtles. En: Avise, J.C. y J.L. Hamrick (eds) *Conservation Genetics: case histories from nature*. Chapman and Hall, New York. pp. 190-237.
- Bowen, B.W. y S.A. Karl. 1996. Population structure, phylogeography, and molecular evolution. pp. 29-50 in P. L. Lutz y J. A. Musick, Editors. *The Biology of Sea Turtles*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bowen, B.W. y S.A. Karl. 1997. Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. In: Lutz, P.L. y J.A. Musick (eds.). *The biology of sea turtles*. CRC Press, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 29–50
- Bowen, B.W. y S.A. Karl. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*. 16:4886-4907
- Bowen, B. W., A. L. Bass, A. García-Rodríguez, C. E. Diez, R. van Dam, A. Bolten, K. A. Bjorndal, M. M. Miyamoto y R. J. Ferl. 1996. Origin of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in a Caribbean feeding area as indicated by mitochondrial DNA sequence analysis. *Ecol. Appl.* (6) 566. En: Bowen, B.W., W.S. Nelson y J.C. Avise (eds). *A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment and conservation relevance*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5574-5577.
- Bowen, B. W., A. M. Clark, F. A. Abreu-Grobois, A. Chaves, H. A. Reichart y R. J. Ferl. 1998. Global phylogeography of ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genética* 101: 179–189.
- Bowen, B. W., A. B. Meylan, J. P. Ross, C. J. Limpus, G. H. Balazs y J. C. Avise. 1992. Global Population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46:865-881.
- Bowen, B. W., J. I. Richardson, A. B. Meylan, D. Margaritoulis, S. Hopkins-Murphy y J. C. Avise. 1993. Population structure of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in the northwest Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conservation Biology* 7: 834-844.
- Bowen, B. W., F. A. Abreu-Grobois, G. H. Balazs, N. Kamezaki, C. J. Limpus y R. J. Ferl. 1995. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3731-3734.
- Bowen, B. W., N. Kamezaki, C. J. Limpus, G. R. Hughes, A. B. Meylan y J. C. Avise. 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by

- mitochondrial DNA genotypes. *Evolution* 48(6): 1829-1828.
- Broderick, D., C. Moritz, J. D. Miller, M. Guinea, R. I. T. Prince y C. J. Limpus. 1994. Genetic studies of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata*: evidence for multiple stocks in Australian waters. *Pacif. Cons. Biol.* 1:123-131.
- Buitrago, J. y H. J. Guada. 2002. La tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) en Venezuela. *INCI.* 27:392-399. ISSN 0378-1844.
- Carr, A. 1952. Handbook of Turtles: The Turtles of the United States, Canada, and Baja California. Cornell University Press, New York. 542 pp.
- Carr, A. 1967. So excellent a Fish: A natural history of Sea Turtles. Scribner, New York, EE.UU.
- Carr, A. 1975. The Ascension Island green turtle colony. *Copeia* 3: 547-555.
- Carr, A. 1987. Impact of nonbiodegradable marine debris on the ecology and survival outlook of sea turtles. *Marine Pollution Bulletin* 18:352-356.
- Carr, A., M. H. Carr y A. B. Meylan. 1978. The ecology and migrations of sea turtles. The west Caribbean green turtle colony. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 162:1-46.
- Carr, A., A. Meyland, J. Mortimer, K. Bjorndal y T. Carr. 1982. Surveys of sea turtle populations and habitats in the western Atlantic. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-91. U.S. Department of commerce.
- Carreras, C., S. Pont, F. Maffucci, M. Pascual, A. Barceló, F. Bentivegna, L. Cardona, F. Alegre, M. SanFélix, G. Fernández y A. Aguilar. 2006. Genetic Structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Marine Biology.* 149:1269-1279.
- Clement M, D. Posada, K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol.* 9:1657-1660.
- Colwell, R. K., and Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society (Series B)* **345**:101-118. (Reprinted in D. L. Hawksworth, ed. *Bio-diversity: Measurement and estimation.* Chapman and Hall, London).
- Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals. CMS. 2006. Appendices I and II.
- Diario Oficial de la Federación. 1990. Decreto de veda total a todas las especies de tortugas marinas. NOM-059-ECOL-1994. Mayo 31 de 1990.
- Debevec, E. M., R. B. Gates, M. Masuda, J. Pella, J. Reynolds. 2000. SPAM. Version 3.2. Statistics Program for Analyzing Mixtures. *Journal of Heredity.* 91:509-510.

- Dethmers K, D. Broderick, C. Moritz, N.N. FitzSimmons, C. Limpus, S. Laveri, S. Whitihg, M. Guinea, R. Prince y R. Kennett. 2006. The genetic structure of Australasian green turtles (*Chelonia mydas*): exploring the geographical scale of genetic exchange. *Molecular Ecology*. Journal compilation.
- Donnelly, M. 1996. Evolución del Tratado sobre Tortugas Marinas del Hemisferio Occidental. *Noticiero de Tortugas Marinas*. 73:22-25.
- Dutton, P.H. 1996. Methods for collection and preservation of simples for sea turtle genetic studies. Pp. 17-24. En: Bowen, B. W. y W. N. Witzell (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. 173 pp.
- Dutton, P. H., Bowen, B. W., Owens, D. W., Barragán, A. R. y Davis, S. K, 1999. Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Zool. Lond.* 248: 397-409.
- Eckert, K. L. 1995. *Darft General Guidelines and Criteria for Management of Threatened and Endangered Marine Turtles in the Wider Caribbean Region*. UNEP (OCA) CAR WG.19 INF. 7. Prepared by WIDECASST for the 3rd Meeting of the Interim Scientific and Technical Advisory Committee to the SPAW Protocol. Kingston, 11-13 October 1995. United Nations Environment Programme, Kingston. 95 pp.
- Encalada, S. E., P. N. Lahanas, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, M. M. Miyamoto y B.W. Bowen. 1996. Phylogeography and population structure of Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*. 5: 473-484.
- Encalada, S. E., J. C. Zurita y B. W. Bowen. 1999. Genetic Consequences of Coastal Development: The Sea Turtle Rookeries at X'cacel, México. *Marine Turtle Newsletter*. 83:8-10.
- Excoffier, L., L. Guillaume y S. Schneider. 2006. Arlequin ver 3.11. An Integrated software package for population genetics data analysis. Computational and molecular population genetics lab (CMPG). Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- FitzSimmons, N. N., C. Moritz y B. W. Bowen. 2000. Identificación de poblaciones. pp. 83-91. En: K. L. Eckert, K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds.)

Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas.
UICN/CSE Grupo especialista en Tortugas Marinas. Pub. No. 4.

- FitzSimmons, N. N., C. Moritz, C. J. Limpus, L. Pope y 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.
- Formia A., B.J. Godley, J.F. Dontaine y M.W. Bruford. 2006. Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtles (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Conservation genetics* 7:353-369.
- Formia A., A.C. Broderick, F. Glen, B.J. Godley, G.C. Hays y M.W. Bruford 2007. Genetic composition of the Ascension Island green turtle rookery based on mitochondrial DNA: implications for sampling and diversity. *Endangered species research*. 3: 145-158.
- Frazier, J. ed. (2005). Marine turtles as flagships. *MAST/Maritime studies (special Issue)*. 3(4):273-303.
- Garduño, M., et al. 2001. Especies sujetas a protección especial. Tortuga blanca, *Chelonia mydas*. pp. 1049-1064. En: M. A. Cisneros, L. F. Beléndez, E. Zárate, M. T. Gaspar, L. C. López, C. Saucedo y J. Tovar (eds.). *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo. 1999-2000*. Publicado en CD. Instituto Nacional de la Pesca/SEMARNAT. México.
- Grant, W.S. y B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. of Heredity* 89: 415-426.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hays, G. C., P. Luschi, F. Papi, C. del Seppia, y R. Marsh. 1999. Changes in behaviour during the inter-nesting period and post-nesting migration for Ascension Island green turtles. *Marine Ecology Progress Series* 189:263-273.
- Hendrickson, J.R. 1980. The ecological strategies of sea turtles. *American Zool.*, 20:597-608.
- Hirth, H. F. 1997. Synopsis of the biological data on the green turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758). United States Fish and Wildlife Service Biological Report 97-1.
- Hurlbert, S. H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*. 52:577-586.
- Jackson, J. B. C. 1997. Reefs since Columbus. *Coral Reefs* 16, Suppl.: S23-S32.
- Johnson, K. 2005. *Las Tortugas Marinas de México*. Ed. Planeta.

- Karl, S., B.W. Bowen y J.C. Avise. 1992. Global population structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear DNA regions. *Genetics* 131:163-173.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kumar, S. K. Tamura y M Nei (2004). MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lagueux, C. J. 1999. Estado de Conservación y Distribución de la Tortuga Verde, *Chelonia mydas*, en la Región del Gran Caribe. (eds) K. L. Eckert y F. A. Abreu. (2001). WIDECAST, IUCN/SSC/MTSG, WWF y PNUMA. 34-37 pp.
- Lahanas, P. N., K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, S. E. Encalada, M. M. Miyamoto, R. A. Valverde y B. W. Bowen. 1998 Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology*. 130:345-352.
- Limpus, C. J., J. D. Miller, C. J. Parmenter, D. Reiner, N. Mclachlan y R. Webb. 1992. Migration of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtles to and from east Australian rookeries. *Wildlife Research*. 19:347-358.
- Limpus C. J., P.J. Couper y M. A. Read. 1994. The green turtle, *Chelonia mydas*, in Queensland: population structure in a warm temperate feeding area. *Mem Queensland Mus* 35:139-154.
- Limpus C. J., J. D. Miller, D. J. Limpus y M. Hamann. 2002. The Raine Island green turtle rookery Y2K update. In: *Proceedings of the twentieth annual symposium on sea turtle biology and conservation* (eds. Mosier A., A. Foley, B. Brost), pp. 132-134. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-477, US Department of Commerce.
- Luke, K., J. A. Horrocks, R. A. LeRoux y P. H. Dutton. 2004. Origins of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding aggregations around Barbados, West Indies. *Marine Biology*. 144: 799-805.
- Márquez, R. 1996. *Las Tortugas Marinas y Nuestro Tiempo*. Fondo de Cultura Económica. México. 101p.
- Merino, I. M. 1984. Aspectos de la circulación costera superficial del Caribe mexicano con base en observaciones utilizando tarjetas de deriva. *Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM. 13:31-46.

- Miller, J. 1997. "Reproduction in Sea Turtles", en Lutz, P. y Musick, J. A. *The Biology of Sea Turtles*, pp-71-81. Florida, CRC Marine Science Series.
- Moncada, F. *et al.* 2006. Migration patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*) in Cuban waters as evidenced by tag and recapture studies. *Herpetology*.
- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesisi SEA, vol. 1. Zaragoza. CYTED, ORCYR-UNESCO y SEA. 84pp.
- Moritz, C. 1994. Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 9:373-375.
- Moritz, C. *et al.* 2002. Population genetics of Southeast Asian and Western Pacific green turtles, *Chelonia mydas*. Final Report to UNEP/CMS. pp 42.
- Musick, J.A. y C.J. Limpus. 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz, P. y J. A. Musick, eds. *The Biology of Sea Turtles*. Page(s) 137-163. Boca Raton, CRC Press Inc.
- Naro-Maciel E., J.E. Becker, E. Lima, M.A. Marcovaldi y R. De Salle. 2007. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Brazil. *Journal of heredity*. 98(1):29–39.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei, M. y S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NORGEN. 2004. DNA Quantification by Gel Densitometry with Norgen DNA Ladders. (citado en diciembre 2004). <http://www.norgenbiotek.com>
- O'Corry-Crowe, G. M., R. S. Suydam, A. Rosenberg, K. J. Frost y A. E. Dizon. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga Whale *Delphinapterus leucas* in the western Neartic revealed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 6:955-970.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6: 288-295.
- Pella, J. J. y G. B. Milner. 1987. Use of genetic marks in stock composition analysis. In *Population genetics and fishery management*: 247–276. Ryman, N. y Utter, F. (Eds). Seattle: University of Washington Press.
- Pritchard, P. C. H., J. A. Mortimer. 1999. Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies. pp. 23-41. En: K. L. Eckert, K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois, M. Donnelly (eds.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. UICN/CSE Grupo especialista en Tortugas Marinas. Pub. No. 4.

- Márquez, R. 1996. Las Tortugas Marinas y Nuestro Tiempo. Fondo de Cultura Económica. México. 101p.
- Protocolo relativo a las Áreas y Flora y Fauna Silvestres Especialmente Protegidas del Convenio para la Protección y el Desarrollo de Medio Marino de la Región del Gran Caribe, "Protocolo SPAW". 1990.
- http://www.cep.unep.org/pubs/legislation/spaw_protocol_esp.html#lista
- Roberts M., T. S. Schwartz y S. A. Karl. 2004. Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*): Analysis of Microsatellite Loci Department of Biology, University of South Florida, pp. 1857-1870.
- Salazar-Vallejo, S.I. 2000. Biogeografía marina del Gran Caribe. Inaterciencia. Departamento de Ecología Acuática. Colegio de la Frontera Sur. Chetumal, Quintana Roo, México. 25:7-12.
- Secretaría Pro Tempore de la Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas. CIT. 2005. San José, Costa Rica. Editado por Dick, Belinda.
- Seminoff, J. 2002. Global status of the green turtle (*Chelonia mydas*). In: Kinan, I. (Ed.), Proceedings of the Western Pacific Sea Turtle Cooperative Research & Management Workshop. Western Pacific Regional Fishery Management Council, Honolulu, pp. 197-211.
- Seminoff, J. A. 2004. *Chelonia mydas*. In: IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 June 2008.
- Siegel, F., R. Z. German. 1982. Rarefaction and Taxonomic Diversity. (ed) J. J. Gart. Shorter Communications. Biometrics. (38)1:235-241.
- Simberloff, D. S. 1972. Properties of the rarefaction diversity measurement. American Naturalist. 106:404-418.
- Simberloff, D. S. 1978. Use of rarefaction and related methods in ecology. In Biological Data in Water Pollution Assessment: Quantitative and Statical Analyses. American Society Testing and Materials STP 652pp. 150-165. Edited by K. L. Dickson, J. Cairns, Jr y R. J. Livingston. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution. 47:264-279.
- Slatkin, M., 1995. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Smith, M.L., K.E. Carpenter y R.W. Waller. 2002. An introduction to the oceanography, geology, biogeography, and fishes of the tropical and subtropical Western Central

- Atlantic. En Carpenter, K.E. (ed.) 2002. *The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic*. Vol. 1: Introduction, molluscs, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes and chimaeras. FAO, Roma.
- Stevenson, D.K. 1981. A review of the marine resources of the WECAFC region. *FAO Documentos técnicos de pesca*, N° 211. 134 págs.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall y C. F. Sing. 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations with haplotypes Inferred from Restriction Endonucleases Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619-633.
- Templeton, A. R. 2002. Optimal Randomization strategies when testing the existence of a phylogeographic structure: a reply to petit and grivet. Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri. *Genetics* 161: 473-475.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, submitted, June 1994, version 1.4. 22:4673-4680.
- Troëng, S. 2001. Exploración petrolera contra Tortugas marinas en el Caribe de Costa Rica. *Ambientico*. No. 92.
- Troëng, S. y E. Rankin. 2005. Long-term conservation efforts contribute to positive green turtle *Chelonia mydas* nesting trend at Tortuguero, Costa Rica. *Biological Conservation*: 121:111-116.
- Weir, B. S., y W. G. Hill. 2002. Estimating F-Statistics. *Genetics*. 36:721-750.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 15: 323-354.
- Wust, G. 1964. Stratifications and Circulation in the Antillean Caribbean Basins. Columbia University Press Nueva York y Londres.

12. ANEXOS

ANEXO I. PROTOCOLO 1:

COLECCIÓN Y PRESERVACIÓN (SIN REFRIGERAR) DE TEJIDO SÓLIDO PARA ANÁLISIS GENÉTICO DEL ADN (Modificado del protocolo de Brian Bowen)

MÉTODOS PARA LA COLECTA DE TEJIDO:

1. Colectar unos cuantos gramos de tejido. Generalmente es suficiente una muestra del tamaño de una canica.
2. Rebanar el tejido con la navaja para favorecer la penetración del buffer.
3. Meter el tejido en un tubo rotulado conteniendo buffer SED
4. Se puede almacenar las muestras a temperatura ambiental durante varios meses, o en refrigerador hasta un año. Evitar la exposición al calor o luz solar.
5. Revisar que queden bien sellados los tubos y guardarlos en doble bolsa de plástico cerrada herméticamente para evitar fugas.

PREPARACIÓN DEL BUFFER SED
1. Añadir 180 g de EDTA-Na ₄ a 1,400 ml de agua dest.
2. Ajustar el pH a 7.5 con Ácido acético glacial ó NaOH
3. Añadir 350 g de NaCl y disolver.
4. Añadir 400 ml DMSO (Dimetil sulfóxido)
5. Aforar a 2 litros con agua destilada.

ANEXO II.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO CLORURO DE LITIO (LiCl)

(Aijanabi y Martínez 1997)

- 1.** Cortar ~50 mg de tejido con una navaja tan finamente como sea posible. Si se usa sangre en buffer de lisis, tomar 200 μ l de sangre. Si la sangre está congelada es más sencillo tomar este volumen raspando el material congelado y transferirlo a un tubo vacío para medir el volumen aproximado contra las marcas al lado del tubo.
- 2.** Colocar el tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 350 μ l de buffer de extracción (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0). Asegurarse de que no queda nada de tejido adherido alrededor de la boca del tubo. Si es sangre, aforar a 400 μ l con buffer de extracción (es decir, añadir 200 μ l del buffer)
- 3.** Agregar 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y agitar brevemente.
- 4.** Colocar en baño maría o en rotador en incubadora a 55 °C toda la noche o hasta que el tejido esté suficientemente digerido.
- 5.** Agregar 300 μ l de LiCl 5M y agitar a temperatura ambiental por un minuto.
- 6.** Agregar 600 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente.
- 7.** Mezclar en el rotador a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente.
- 8.** Centrifugar a 13,000 X g por 15 minutos.
- 9.** Extraer con pipeta 500 μ l de la capa acuosa (parte superior) y transferir a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Tener cuidado de no extraer material de la interfase (capa media). En caso de extraer parte de esta, regresar la muestra al tubo y centrifugar por 5 minutos para después repetir este paso.
- 10.** Agregar 50 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1000 μ l de etanol al 100% frío.
- 11.** Invertir el tubo varias veces y colocarlo en el congelador a -20 °C por lo menos una hora (o 30 minutos a -80°C). También puede dejarse toda la noche
- 12.** Centrifugar a máxima velocidad por 20 minutos. Para obtener mayor cantidad de ADN puede ponerse una centrifuga pequeña en el refrigerador (4 °C).
- 13.** Remover el líquido del tubo teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN.
- 14.** Agregar 750 μ l de etanol al 70% y mezclar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 15.** Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos.
- 16.** Remover el etanol con sumo cuidado.

- 17.** Secar el pellet en centrifuga de vacío por 10 minutos o hasta que esté seco.
- 18.** Agregar 50 μl de TE 1x pH 8.0 para resuspender el pellet. Si se nota que hay mucho DNA se debe aumentar la cantidad de TE.
- 19.** Permitir que el pellet se resuspenda a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante la noche o 30 minutos a temperatura ambiente.
- 20.** Mezclar la muestra para asegurar que el pellet está totalmente disuelto.
- 21.** Para estimar la calidad y cantidad de ADN, correr un minigel de agarosa 1% (3 μl de ADN y 2 μl de loading buffer).

ANEXO III.

PROTOCOLO PARA MEDIR CONCENTRACIÓN DE ADN MEDIANTE DENSITOMETRÍA

- 1.** Hacer una dilución 1:10 de cada muestra de ADN.
- 2.** Poner 2 μ l de muestra más 2 μ l de Dye por pozo.
- 3.** Poner 5 μ l de Ladder.
- 4.** Correr la electroforesis durante 1:20 hr a un voltaje de 48-50 V, en el caso del ADN, y durante 1:30 hr a un voltaje de 37 V, en el caso de la PCR.
- 5.** Sumergir el gel en la solución de Bromuro de Etidio durante 30 minutos.
- 6.** Tomar la foto.
- 7.** Pasar la imagen al programa COREL Photo Paint-12. Separar en canales RGB y utilizar el Rojo. Invertir los colores. Guardar en formato Tif.
- 8.** Exportar imagen al programa SCION. Medir en una escala de Pixeles.
- 9.** Tomar el área de cada banda (Ladder, muestras de ADN y blanco).
- 10.** Cargar los resultados en la plantilla de Excel, y ubicarlos en la posición que les corresponda para que efectúe los cálculos.

ANEXO IV

PROTOCOLO DEL KIT DE PURIFICACION PARA PCR MINELUTE

Este protocolo esta diseñado para purificar DNA de hebra doble de fragmentos de reacciones de PCR resultando en altas concentraciones finales de DNA. Fragmentos de 70 pb a 4 kb son purificados, eliminando primers, nucleotidos, polimerasas y sales usando columnas MinElute en una microcentrífuga. La capacidad de asociación de la columna MinElute es de un máximo de 5 µg de DNA.

Puntos importantes antes de iniciar

- El color amarillo del Buffer PBI indica un pH ≤ 7.5
- Adicionar etanol* (96-100%) al Buffer PE antes de usar (revisar el volumen especificado en la etiqueta).
- Todos los pasos de las centrifugaciones son de $\geq 10,000$ x g en una microcentrífuga convencional a temperatura ambiental.

PROCEDIMIENTO

1. **Colocar 5 volúmenes de buffer PBI por cada 1 volumen de la reacción de PCR y mezclar.** No es necesario remover aceites minerales o keroseno. Ej. a 50µl de la reacción de PCR (no incluyendo aceite) adicionar 250µl de Buffer PBI.
2. **Asegurar que el color de la mezcla sea amarillo (parecido al Buffer PBI sin la muestra de PCR).** Si el color de la mezcla es naranja o violeta, adicionar 10µl de acetato de sodio 3M, pH 5.0, y mezclar. El color de la mezcla se debe tornar amarilla.
3. **Poner una columna MinElute en uno de los tubos de colecta de 2 ml y colocarlo en una gradilla apropiada.**
4. **Para pegar (asociar) el DNA, aplicar la muestra en la columna MinElute y centrifugar por 1 min.** Para tener máxima recuperación, transferir todas las trazas de la muestra a la columna.
5. **Desechar el fluido que pasa por la columna. Poner la columna MinElute de regreso en el tubo de colecta.**
6. **Para lavar, agregar 750µl Buffer PE a la columna MinElute y centrifugar por 1 min.**
7. **Desechar el fluido que pasa por la columna y poner la columna MinElute de regreso en el tubo de colecta. Centrifugar la columna por 1 min. más a máxima velocidad.**

IMPORTANTE: El etanol residual del Buffer PE no será completamente eliminado a menos que el fluido que pasa sea desechado antes de la centrifugación adicional.

8. **Poner la columna MinElute en un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5ml.**
9. **Para eluir el DNA, añadir 10µl de Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) [para Macrogen se usa buffer TE (1 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5)] o agua al centro de la membrana, dejar que la columna repose por 1 min. y luego centrifugar por 1 min.**

IMPORTANTE: Asegurar que el buffer de elusión se dispensa directamente al centro de la membrana para lograr una completa elusión del DNA pegado (asociado). El volumen promedio de la elusión resultante es de 9 µl a partir de un volumen de 10µl de buffer de elusión.

La eficiencia de la elusión depende del pH. La máxima eficiencia de la elusión se consigue entre pH 7.0 y 8.5. Cuando se usa agua, cerciorarse que el valor de pH esta dentro del rango, y almacenar el DNA a -20°C ya que el DNA puede degradarse en la ausencia de un agente amortiguador. El DNA puede también ser eluido en TE, pero el EDTA puede inhibir subsecuentes reacciones enzimáticas.

10. **Si se estará analizando el DNA en un gel, agragar 1 volumen de LOADING DYE a 5 volúmenes de DNA purificado. Mezcle la solución pipeteando arriba y abajo antes de cargar el gel.**

El dye de carga (loading dye) contiene 3 tintes marcadores (bromofenol azul, cyanol de xileno y naranja G) que facilita estimación de la distancia de migración del DNA y la optimización del tiempo de corrida en la gel de agarosa. Refiérase a la Tabla 3 para la identificación de las tinciones de acuerdo a la distancia de migración y el porcentaje y tipo de agarosa.

- No usar alcohol desnaturalizado, puede contener otras sustancias como el metanol o methylethylketone.

ANEXO V																			
Información general de las muestras																			
Prefijo num cat	Num cat	Fecha ingreso	Tej	# marca	Fecha desove	Fecha colecta	clave sexo	habitat	num nido	sitio	Estado	Región	Fecha extracción	Fecha PCR	Primers	Num PCR	d-loop hapl	observaciones	
Cm	126	24-nov-05	H	XE247, EK554	16/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	AV522	Aventuras	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	n/s	NA	REPETIDA	
Cm	135	24-nov-05	C/A	XE247, EK554	16/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	AV522	Aventuras	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3610	CM-A3	REPETIDA	
Cm	134	24-nov-05	ND	XK417, XK515	13/08/2005	11/10/2005	crías	Anidación	CP653	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3609	CM-A3		
Cm	153	24-nov-05	ND	XH220, XH221	17/08/2005	11/10/2005	crías	Anidación	CP700	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4209	CM-A3		
Cm	158	24-nov-05	ND	HK261, XC785	10/08/2005	11/10/2005	crías	Anidación	CP635	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3627	CM-A1.1		
Cm	159	24-nov-05	ND	XM421, XM422	09/08/2005	08/10/2005	crías	Anidación	CP631	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3628	CM-A3		
Cm	584	21-dic-06	S	XE543 - XC095	01/08/2006	30/09/2006	crías	Anidación	CP305	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H950	3951	CM-A16		
Cm	585	21-dic-06	S	XP489	29/07/2006	24/09/2006	crías	Anidación	CP286	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H950	3952	CM-A26		
Cm	586	21-dic-06	S	XP402 - XN357	04/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	CP333	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H951	3953	CM-A16		
Cm	587	21-dic-06	S	XH939 - EB627	25/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	CP242	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H952	3954	CM-A28		
Cm	588	21-dic-06	S	XP473	08/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	CP209	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H953	3955	CM-A3		
Cm	589	21-dic-06	S	XP487	26/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	CP257	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	590	21-dic-06	S	749 - XC912	22/07/2006	24/09/2006	crías	Anidación	CP266	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	591	21-dic-06	S	XP630	03/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	CP320	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	592	21-dic-06	S	XH915, XC555	22/07/2006	04/10/2006	crías	Anidación	CP229	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H957	3956	CM-A16		
Cm	593	21-dic-06	S	XP499	27/07/2006	26/09/2006	crías	Anidación	CP247	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H958	3957	CM-A3	sangre en mal estado pero con ADN	
Cm	594	21-dic-06	S	XN064, XC234	05/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	CP345	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H959	3958	CM-A26		
Cm	595	21-dic-06	S	XH397, XH398	01/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	CP313	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	596	21-dic-06	S	XP640	04/08/2006	27/09/2006	crías	Anidación	CP334	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H961	3959	CM-A1.2		
Cm	597	21-dic-06	S	KJ343, XC282	27/07/2006	27/09/2006	crías	Anidación	CP279	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H962	3960	CM-A16		
Cm	598	21-dic-06	S	XP471	30/07/2006	27/09/2006	crías	Anidación	CP300	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H963	3961	CM-A3		
Cm	599	21-dic-06	S	XN381	01/08/2006	28/09/2006	crías	Anidación	LB054	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H964	3962	CM-A3		
Cm	600	21-dic-06	S	XN366, XN367	07/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	LB059	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H965	3963	CM-A16		
Cm	601	21-dic-06	S	XN386	10/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	LB063	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	24/05/2007	LCM15382/H966	3964	CM-A3		
Cm	602	21-dic-06	S	XK471	01/08/2006	30/09/2006	crías	Anidación	CP310	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H967	3965	CM-A3		
Cm	603	21-dic-06	S	XP633	04/08/2006	22/08/2006	crías	Anidación	LB057	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H968	3966	CM-A26		
Cm	604	21-dic-06	S	XN378, XN382	06/08/2006	28/09/2006	crías	Anidación	LB058	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H969	3967	CM-A3		
Cm	605	21-dic-06	S	XP3634	04/08/2006	28/09/2006	crías	Anidación	LB056	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H970	3968	CM-A3		
Cm	606	21-dic-06	S	XP218, XE450	19/07/2006	24/09/2006	crías	Anidación	CP183	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	607	21-dic-06	S	XN181, EB625	21/07/2006	04/10/2006	crías	Anidación	CP203	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	608	21-dic-06	S	XN380	10/08/2006	05/10/2006	crías	Anidación	LB064	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H973	3969	CM-A16		
Cm	609	21-dic-06	S	XP481	04/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	CP340	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H974	3970	CM-A16		
Cm	610	21-dic-06	S	J5795, XP606	17/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	CP438	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H975	3971	CM-A28		
Cm	611	21-dic-06	S	XB113	17/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	CP441	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H976	3972	CM-A18.2		
Cm	612	21-dic-06	S	XR106	16/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	CP432	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H977	3973	CM-A16		
Cm	613	21-dic-06	S	J3768, XC300	05/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	CP424	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H978	3974	CM-A3		
Cm	614	21-dic-06	S	XH290, XH291	22/08/2006	17/10/2006	crías	Anidación	CP465	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	no hay muestra	
Cm	615	21-dic-06	S	XN093, XN094	24/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	CP520	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H980	3975	CM-A26		
Cm	616	21-dic-06	S	EK132, XB155	18/08/2006	24/10/2006	crías	Anidación	CP450	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H981	3976	CM-A3		
Cm	617	21-dic-06	S	NA	NA	NA	crías	Anidación	CP483	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado	
Cm	618	21-dic-06	S	XH290, XH291	NA	NA	crías	Anidación	CP435	Cahpechen	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	24/05/2007	LCM15382/H983	3977	CM-A16		
Cm	567	21-dic-06	C/A	NA	NA	29/08/2006	crías	Anidación	CH041	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3936	NA		
Cm	568	21-dic-06	S	NA	NA	13/10/2006	crías	Anidación	CH139	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	no hay muestra	
Cm	569	21-dic-06	S	XP662	NA	16/10/2006	crías	Anidación	CH134	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3937	NA		
Cm	570	21-dic-06	S	HX159 - XE012	NA	16/10/2006	crías	Anidación	CH140	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3938	NA		
Cm	571	21-dic-06	S	XH122 - XH121	NA	16/10/2006	crías	Anidación	CH144	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3939	NA		
Cm	572	21-dic-06	S	NA	NA	16/10/2006	crías	Anidación	CH147	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra	
Cm	573	21-dic-06	S	XN448 - XH798	NA	25/10/2006	crías	Anidación	CH148	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3749	NA		
Cm	574	21-dic-06	S	EK794 - XP674	NA	25/10/2006	crías	Anidación	CH151	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3750	NA		
Cm	575	21-dic-06	S	XP662 - XP666	NA	27/10/2006	crías	Anidación	CH150	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3940	NA		
Cm	576	21-dic-06	S	XN179 - XN480	NA	13/10/2006	crías	Anidación	CH130	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3941	NA		
Cm	577	21-dic-06	S	XP350 - XP290	NA	16/10/2006	crías	Anidación	CH187	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3942	NA		
Cm	578	21-dic-06	S	XP812	NA	16/10/2006	crías	Anidación	CH141	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3943	NA		

Prefijo num cat	Num cat	Fecha ingreso	Tej	# marca	Fecha desove	Fecha colecta	clave sexo	habitat	num nido	sitio	Estado	Región	Fecha extracción	Fecha PCR	Primers	Num PCR	d-loop hapl	observaciones
Cm	579	21-dic-06	S	XH790 - XH791	NA	19/09/2006	crías	Anidación	CH084	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	580	21-dic-06	S	XN487	NA	19/09/2006	crías	Anidación	CH078	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	581	21-dic-06	S	XN462 - XN476	NA	19/09/2006	crías	Anidación	CH077	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	582	21-dic-06	S	XP169 - XH791	NA	19/09/2006	crías	Anidación	CH080	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	583	21-dic-06	S	KJ896	NA	19/09/2006	crías	Anidación	CH076	Chemuyil	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cc	641	09-mar-07	M	NA	NA	11/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3905	NA	
Cc	642	09-mar-07	M	NA	NA	12/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3906	NA	
Cm	643	09-mar-07	M	NA	NA	15/08/2006	crías	Anidación	21	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3744	CM-A16	
Cc	644	09-mar-07	M	NA	NA	11/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3907	NA	
Cm	645	09-mar-07	M	NA	NA	15/08/2006	crías	Anidación	21	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/03/2007	LCM15382/H950	3722	CM-A16	
Cc	646	09-mar-07	M	NA	NA	17/08/2006	crías	Anidación	21	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3908	NA	
Cc	647	09-mar-07	M	NA	NA	17/08/2006	crías	Anidación	35	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3909	NA	
Cm	648	09-mar-07	M	NA	NA	19/08/2006	crías	Anidación	28	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3766	CM-A3	
Cm	649	09-mar-07	M	NA	NA	18/08/2006	crías	Anidación	59	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3745	CM-A3	
Cm	650	09-mar-07	M	NA	NA	18/08/2006	crías	Anidación	29	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3767	CM-A18.2	
Cm	651	09-mar-07	M	NA	NA	18/08/2006	crías	Anidación	19	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3768	CM-A3	
Cm	652	09-mar-07	M	NA	NA	25/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3769	CM-A1.2	
Cm	653	09-mar-07	M	NA	NA	31/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3770	CM-A3	
Cm	654	09-mar-07	M	NA	NA	31/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3771	CM-A1.2	
Cm	655	09-mar-07	M	NA	NA	31/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3910	CM-A3	
Cm	656	09-mar-07	M	NA	NA	31/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3911	CM-A3	
Cm	657	09-mar-07	M	NA	NA	07/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	20/04/2007	LCM15382/H950	3731	CM-A3	
Cm	658	09-mar-07	M	NA	NA	11/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	26/03/2007	LCM15382/H950	3725	CM-A26	
Cm	659	09-mar-07	M	NA	NA	11/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3912	CM-A18.2	
Cc	660	09-mar-07	M	NA	NA	11/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3913	NA	
Cc	661	09-mar-07	M	NA	NA	07/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3914	NA	
Cm	662	09-mar-07	M	NA	NA	07/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3915	CM-A16	
Cm	663	09-mar-07	M	NA	NA	07/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3916	CM-A1.2	
Cm	664	09-mar-07	M	NA	NA	07/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	14/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3917	CM-A26	
Cm	665	09-mar-07	M	NA	NA	07/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3918	CM-A18.2	
Cc	666	09-mar-07	M	NA	NA	11/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	26/03/2007	H950/LTEi9	3723	NA	
Cm	667	09-mar-07	M	NA	NA	12/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4085	CM-A3	Sin datos
Cm	668	09-mar-07	M	NA	NA	13/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	14/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4086	CM-A1.2	Sin datos
Cm	669	09-mar-07	M	NA	NA	13/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4087	CM-A1.1	Sin datos
Cm	670	09-mar-07	M	NA	NA	13/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	26/03/2007	H15382 y H950/L	3724	CM-A3	Sin datos
Cm	671	09-mar-07	M	NA	NA	13/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4088	CM-A1.2	Sin datos
Cm	672	09-mar-07	M	NA	NA	17/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4089	CM-A3	Sin datos
Cm	673	09-mar-07	M	NA	NA	17/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4090	CM-A3	Sin datos
Cm	674	09-mar-07	M	NA	NA	27/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4091	CM-A1.2	Sin datos
Cm	675	09-mar-07	M	NA	NA	27/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	14/03/2007	25/03/2007	LCM15382/H950	4092	CM-A1.2	Sin datos
Ei	676	09-mar-07	M	NA	NA	06/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	NA	NA	NA	NA	
Cm	640	09-mar-07	M	NA	NA	10/08/2006	crías	Anidación	NA	Cozumel	Quintana Roo	Caribe	13/03/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3764	CM-A2	
Cm	435	21-dic-06	M	NA	23/07/06	23/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3893	CM-A18.2	
Cm	436	21-dic-06	M	NA	23/07/2006	23/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3894	CM-A18.2	
Cm	437	21-dic-06	M	NA	24/07/2006	24/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3895	CM-A3	
Cm	438	21-dic-06	M	NA	26/07/2006	24/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3896	CM-A3	
Cm	439	21-dic-06	M	TTT515-TTT473	NA	26/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3897	CM-A1.2	
Cm	440	21-dic-06	M	TTT517-TTT518	27/07/2006	26/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3898	CM-A18.2	
Cm	441	21-dic-06	M	D TTT473-TTT473	29/07/2006	27/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3899	CM-A16	
Cm	442	21-dic-06	M	TTT520TTT519	31/07/2006	29/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	25/05/2007	LCM15382/H950	4010	CM-A3	extraida mal con fenol
Cm	443	21-dic-06	M	TTT494izqTTT493	31/07/2006	31/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	25/05/2007	LCM15382/H950	4011	CM-A1.2	extraida mal con fenol
Cm	444	21-dic-06	M	NA	31/07/2006	31/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	25/05/2007	LCM15382/H950	4012	CM-A16	extraida mal con fenol
Cm	445	21-dic-06	M	TTT490/TTT489	NA	31/07/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3900	CM-A1.2	
Cm	446	21-dic-06	M	RJ488-129-TTT532	26/08/2006	09/08/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3901	CM-A1.2	
Cm	447	21-dic-06	M	TTT548/TTT549	28/08/2006	26/08/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3902	CM-A18.2	extraida mal con fenol

Prefijo num cat	Num cat	Fecha ingreso	Tej	# marca	Fecha desove	Fecha colecta	clave sexo	habitat	num nido	sitio	Estado	Región	Fecha extracción	Fecha PCR	Primers	Num PCR	d-loop hapl	observaciones
Cm	448	21-dic-06	M	TTT550 /TTT551	03/09/2006	26/08/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3903	CM-A3	
Cm	449	21-dic-06	M	KJ 436 /TTT554	NA	03/09/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	25/05/2007	LCM15382/H950	4013	CM-A18.2	extraida mal con fenol
Cm	450	21-dic-06	M	Tomado a cria	NA	21/09/2006	crías	Anidación	NA	Holbox	Quintana Roo	Caribe/GM	01/02/2007	22/05/2007	LCM15382/H950	3904	CM-A16	Tomado a cria
Cm	128	24-nov-05	H/M	XM245, XM246	08/08/2005	07/10/2005	crías	Anidación	KZ443	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3606	CM-A3	
Cm	129	24-nov-05	H/M	XN101, XN102	04/08/2005	04/10/2005	crías	Anidación	KZ399	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4204	CM-A22	
Cm	131	24-nov-05	H/M	XK338, XK332	03/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	KZ392	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3607	CM-A2	
Cm	132	24-nov-05	H/M	XM220, XE465	28/07/2005	07/10/2005	crías	Anidación	KZ360	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4206	CM-A16	ya no hay muestra
Cm	133	24-nov-05	H/M	XK509, XK517	04/08/2005	29/10/2005	crías	Anidación	KZ401	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3608	CM-A22	
Cm	147	24-nov-05	H/M	XN132, XN133	10/08/2005	07/10/2005	crías	Anidación	KZ465	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3621	CM-A1.1	
Cm	154	24-nov-05	H/M	XN114, XN155	07/08/2005	12/10/2005	crías	Anidación	KZ432	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4210	CM-A3	
Cm	155	24-nov-05	H/M	XM239, XM240	10/08/2005	12/10/2005	crías	Anidación	KZ471	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4211	CM-A3	ya no hay muestra
Cm	156	24-nov-05	H/M	XK276, XB455	12/08/2005	09/10/2005	crías	Anidación	KZ503	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	NA	NA	NA	NA	No salio ADN, ya no hay muestra
Cm	157	24-nov-05	H/M	XK429, XB160	10/08/2005	12/10/2005	crías	Anidación	KZ470	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3626	CM-A22	
Cm	502	21-dic-06	S	XP479	23/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	KZ256	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	26/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3814	CM-A1.2	
Cm	503	21-dic-06	S	XN076 - XC626	23/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	KZ261	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3815	CM-A2	
Cm	504	21-dic-06	S	XP460	25/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	KZ271	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3816	CM-A16	
Cm	505	21-dic-06	S	EK529 - XB429	20/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ234	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4106	CM-A16	
Cm	506	21-dic-06	S	NA	01/08/2006	23/09/2006	crías	Anidación	KZ320	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No se consevo , no hay ADN
Cm	507	21-dic-06	S	XP221 - XP232	31/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ314	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4107	CM-A16	REPETIDA 513 sangre en mal estado
Cm	508	21-dic-06	S	XP213 - XH340	21/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ253	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4108	CM-A26	
Cm	509	21-dic-06	S	NA	19/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ228	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4109	CM-A3	
Cm	510	21-dic-06	S	KJ721 - XC243	29/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ309	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4110	CM-A16	
Cm	511	21-dic-06	S	EK119 - XB171	21/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ237	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4111	CM-A28	
Cm	512	21-dic-06	S	XE499 - XE500	28/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ306	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	26/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	3817	CM-A16	
Cm	513	21-dic-06	S	XP221 - XP232	22/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ250	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	26/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4112	CM-A16	misma madre que 506
Cm	514	21-dic-06	S	XN191 - XN190	21/07/2006	22/09/2006	crías	Anidación	KZ243	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3819	CM-A3	
Cm	515	21-dic-06	S	XP204 - XP203	27/07/2006	23/09/2006	crías	Anidación	KZ301	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3820	CM-A17	
Cm	516	21-dic-06	S	XH386 - XH387	26/07/2006	23/09/2006	crías	Anidación	KZ285	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	26/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3821	CM-A16	
Cm	517	21-dic-06	S	XP272 - XP281	30/07/2006	23/09/2006	crías	Anidación	KZ297	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	26/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3822	CM-A28	
Cm	518	21-dic-06	S	XP609	01/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ317	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4113	CM-A26	
Cm	519	21-dic-06	S	XP604	03/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ335	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4114	CM-A22	
Cm	520	21-dic-06	S	NA	07/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ327	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	521	21-dic-06	S	EK379 - XB461	05/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ348	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4115	CM-A2	
Cm	522	21-dic-06	S	XP205 - XP206	02/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ328	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4116	CM-A16	
Cm	523	21-dic-06	S	XP286 - XP287	01/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ318	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	12/05/2007	LCM15382/H950	3823	CM-A1.1	
Cm	524	21-dic-06	S	XB328 - XE496	02/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ330	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	11/05/2007	LCM15382/H950	3824	CM-A16	
Cm	525	21-dic-06	S	XE570	02/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ325	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4117	CM-A1.2	
Cm	526	21-dic-06	S	EB803 - XB855	02/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ326	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3845	CM-A3	
Cm	527	21-dic-06	S	XN128 - XN129	03/08/2006	26/09/2006	crías	Anidación	KZ339	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3846	CM-A22	
Cm	528	21-dic-06	S	XP483	28/07/2006	28/10/2006	crías	Anidación	KZ304	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4118	CM-A22	
Cm	529	21-dic-06	S	XP484	28/07/2006	28/10/2006	crías	Anidación	KZ305	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4119	CM-A22	
Cm	530	21-dic-06	S	XP480	02/08/2006	28/10/2006	crías	Anidación	KZ329	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3847	CM-A3	
Cm	531	21-dic-06	S	XP603	01/08/2006	30/10/2006	crías	Anidación	KZ324	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3848	CM-A16	
Cm	532	21-dic-06	S	XE425 - XC099	05/08/2006	30/10/2006	crías	Anidación	KZ353	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3849	CM-A28	
Cm	533	21-dic-06	S	XE419	31/07/2006	30/10/2006	crías	Anidación	KZ322	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3850	CM-A2	
Cm	534	21-dic-06	S	XP242	04/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	KZ341	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3851	CM-A26	
Cm	535	21-dic-06	S	XC518 - HK019	06/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	KZ360	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3852	CM-A22	
Cm	536	21-dic-06	S	HK037 - XC612	04/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	KZ344	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3853	CM-A26	
Cm	537	21-dic-06	S	XP617 - XP618	07/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	KZ362	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4120	CM-A2	
Cm	538	21-dic-06	S	XP612	12/08/2006	02/10/2006	crías	Anidación	KZ395	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3854	CM-A3	
Cm	539	21-dic-06	S	XN197 - XN199	12/08/06	03/10/2006	crías	Anidación	KZ397	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3855	CM-A26	
Cm	540	21-dic-06	S	XH358 - XP266	08/08/2006	03/10/2006	crías	Anidación	KZ369	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3856	CM-A18.2	
Cm	541	21-dic-06	S	XP625	09/08/2006	03/10/2006	crías	Anidación	KZ379	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4121	CM-A2	
Cm	542	21-dic-06	S	XN373 - XC634	09/08/2006	06/10/2006	crías	Anidación	KZ383	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4122	CM-A1.2	
Cm	543	21-dic-06	S	XP824	12/08/2006	06/10/2006	crías	Anidación	KZ387	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3857	CM-A22	

Prefijo num cat	Num cat	Fecha ingreso	Tej	# marca	Fecha desove	Fecha colecta	clave sexo	habitat	num nido	sitio	Estado	Región	Fecha extracción	Fecha PCR	Primers	Num PCR	d-loop hapl	observaciones
Cm	544	21-dic-06	S	XP118	29/07/2006	06/10/2006	crías	Anidación	KZ292	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4093	CM-A2	
Cm	545	21-dic-06	S	XN090 - XN091	08/08/2006	06/10/2006	crías	Anidación	KZ372	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4094	CM-A22	
Cm	546	21-dic-06	S	XP244 - XP245	14/08/2006	12/10/2006	crías	Anidación	KZ412	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4095	CM-A1.2	
Cm	547	21-dic-06	S	XH277 - XR009	16/08/2006	12/10/2006	crías	Anidación	KZ433	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4096	CM-A26	
Cm	548	21-dic-06	S	XP477	13/08/2006	12/10/2006	crías	Anidación	KZ402	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4097	CM-A16	
Cm	549	21-dic-06	S	XP608 - XR018	21/08/2006	14/10/2006	crías	Anidación	KZ454	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4098	CM-A16	
Cm	550	21-dic-06	S	XN3073 - XN074	15/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	KZ420	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	29/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4099	CM-A26	
Cm	551	21-dic-06	S	XH395 - XH396	23/08/2006	17/10/2006	crías	Anidación	KZ477	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4100	CM-A16	
Cm	552	21-dic-06	S	XH305 - XH306	23/08/2006	17/10/2006	crías	Anidación	KZ478	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4101	CM-A22	CIEGA
Cm	553	21-dic-06	S	XE598 - XE599	18/08/2006	17/10/2006	crías	Anidación	KZ441	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4102	CM-A16	
Cm	554	21-dic-06	S	XP262 - XP263	20/08/2006	17/10/2006	crías	Anidación	KZ451	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4103	CM-A18.2	REPETIDA
Cm	555	21-dic-06	S	XN064 - XC234	NA	25/10/2006	crías	Anidación	KZ484	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4104	CM-A26	CP
Cm	556	21-dic-06	S	XN087 - XR105	NA	25/10/2006	crías	Anidación	KZ502	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4123	CM-A16	
Cm	557	21-dic-06	S	XP253 - XP254	NA	25/10/2006	crías	Anidación	KZ505	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4124	CM-A26	
Cm	558	21-dic-06	S	XR.032 - XR033	NA	25/10/2006	crías	Anidación	KZ496	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4125	CM-A26	
Cm	559	21-dic-06	S	HK259 - XC782	NA	27/10/2006	crías	Anidación	KZ501	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4126	CM-A3	
Cm	560	21-dic-06	S	EK126 - XP299	NA	27/10/2006	crías	Anidación	KZ524	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4127	CM-A1.1	
Cm	561	21-dic-06	S	KJ006 - XB430	NA	30/10/2006	crías	Anidación	KZ515	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4154	CM-A3	
Cm	562	21-dic-06	S	XR039 - XR047	NA	30/10/2006	crías	Anidación	KZ537	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4155	CM-A26	NO CORRESPONDE A LA T..K2535
Cm	563	21-dic-06	S	NA	NA	30/10/2006	crías	Anidación	KZ535	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4156	CM-A16	
Cm	564	21-dic-06	S	EK398 - XJ041	NA	30/10/2006	crías	Anidación	KZ536	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4157	CM-A3	
Cm	565	21-dic-06	S	XP249 - XR004	NA	30/10/2006	crías	Anidación	KZ538	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4158	CM-A16	
Cm	566	21-dic-06	S	XH388 - XH389	NA	30/10/2006	crías	Anidación	KZ564	Kanzul	Quintana Roo	Caribe	30/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4159	CM-A2	
Cm	136	24-nov-05	ND	XJ296, XJ297	09/08/2005	27/09/2005	crías	Anidación	XC1182	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3611	CM-A3	
Cm	137	24-nov-05	ND	XM648, XM649	24/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	XC1446	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3612	CM-A26	
Cm	138	24-nov-05	ND	KJ935, XM080	05/08/2005	28/09/2005	crías	Anidación	XC1091	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3613	CM-A1.1	
Cm	139	24-nov-05	ND	XM669, XC302	13/08/2005	30/09/2005	crías	Anidación	XC1279	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3614	CM-A22	
Cm	140	24-nov-05	ND	KJ942, XM582	22/08/2005	30/09/2005	crías	Anidación	XC1418	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3615	CM-A3	
Cm	141	24-nov-05	ND	XM049, XM050	06/08/2005	30/09/2005	crías	Anidación	XC1116	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3616	CM-A3	
Cm	142	24-nov-05	ND	XM897, XM898	18/08/2005	15/10/2005	crías	Anidación	XC1351	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3617	CM-A1.1	
Cm	143	24-nov-05	ND	XM015, XC487	28/08/2005	11/10/2005	crías	Anidación	XC1482	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3618	CM-A22	
Cm	144	24-nov-05	ND	XK930, XJ284	13/08/2005	11/10/2005	crías	Anidación	XC1262	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3619	CM-A22	
Cm	145	24-nov-05	ND	XK386, EB000	11/08/2005	08/10/2005	crías	Anidación	XC1194	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3620	CM-A26	
Cm	146	24-nov-05	ND	J4667, BB381	18/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	XC1361	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4207	CM-A3	
Cm	148	24-nov-05	ND	XM659, XM660	05/08/2005	30/09/2005	crías	Anidación	XC1090	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3622	CM-A26	
Cm	149	24-nov-05	ND	EK163, XB214	23/08/2005	01/10/2005	crías	Anidación	XC1430	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4208	CM-A16	
Cm	150	24-nov-05	ND	KJ107, XC147	06/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	XC1123	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3623	CM-A1.1	
Cm	151	24-nov-05	ND	XM657, XM650	07/08/2005	06/10/2005	crías	Anidación	XC1133	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3624	CM-A17	
Cm	152	24-nov-05	ND	XM612, XM613	14/08/2005	07/10/2005	crías	Anidación	XC1267	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	05/12/2005	24/03/2006	H950/LTEi9	3625	CM-A3	
Cm	451	21-dic-06	M	XP921-922	NA	26/08/2006	crías	Anidación	XC268	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	452	21-dic-06	M	xp957, xp958	10/07/2006	31/08/2006	crías	Anidación	XC253	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4070	CM-A18.2	
Cm	453	21-dic-06	M	XP327, XP326	07/07/2006	03/09/2006	crías	Anidación	XC265	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4071	CM-A3	
Cm	454	21-dic-06	M	XP339, XP332	09/07/2006	08/09/2006	crías	Anidación	XC481	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4072	CM-A2	
Cm	455	21-dic-06	S	XP353, XP352	21/07/2006	15/09/2006	crías	Anidación	XC400	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4073	CM-A17	
Cm	456	21-dic-06	S	XP915, XP916	23/07/2006	19/09/2006	crías	Anidación	XC560	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3811	CM-A16	
Cm	457	21-dic-06	S	XP388, XP389	26/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XC503	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3818	CM-A3	
Cm	458	21-dic-06	S	J3706, XP994	24/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XC540	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	459	20-dic-06	S	XP987, XP998	27/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XC537	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	460	20-dic-06	S	XP373, XP371	27/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XC539	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	sangre en mal estado
Cm	461	20-dic-06	S	NA	27/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XC578	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3842	CM-A1.1	
Cm	462	20-dic-06	S	KJ971, XC427	NA	21/09/2006	crías	Anidación	XC546	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3843	CM-A18.2	
Cm	463	20-dic-06	S	XP320, XP321	28/07/2006	23/09/2006	crías	Anidación	XC549	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	14/05/2007	LCM15382/H950	3844	CM-A28	
Cm	464	20-dic-06	M	XH099, XH877	29/07/2006	23/09/2006	crías	Anidación	XC609	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4074	CM-A3	
Cm	465	20-dic-06	M	XP943, XP218	30/07/2006	23/09/2006	crías	Anidación	XC572	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	26/06/2007	LCM15382/H950	4160	CM-A3	
Cm	466	20-dic-06	M	EK294, XB487	NA	25/09/2006	crías	Anidación	XC575	X'Cancel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4075	CM-A3	

Prefijo num cat	Num cat	Fecha ingreso	Tej	# marca	Fecha desove	Fecha colecta	clave sexo	habitat	num nido	sitio	Estado	Región	Fecha extracción	Fecha PCR	Primers	Num PCR	d-loop hapl	observaciones
Cm	467	20-dic-06	S	XP822	NA	25/09/2006	crías	Anidación	XC684	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4076	CM-A22	
Cm	468	20-dic-06	S	J5645 - XC148	06/08/2006	30/09/2006	crías	Anidación	XC925	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4077	CM-A1.1	
Cm	469	20-dic-06	S	XP701, XP879	21/08/2006	16/10/2006	crías	Anidación	XC912	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4078	CM-A17	
Cm	470	20-dic-06	S	FS648-J4686, XH830	20/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC848	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4079	CM-A16	
Cm	471	20-dic-06	S	XH159, XC670	19/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC849	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4080	CM-A16	
Cm	472	20-dic-06	S	XM987, XM952	19/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC952	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4081	CM-A22	
Cm	473	20-dic-06	S	FS655, XP862	24/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC924	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4082	CM-A3	
Cm	474	20-dic-06	S	XN300, XH927	21/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC967	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4083	CM-A3	
Cm	475	20-dic-06	S	XP387 - XP386	28/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC864	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3742	CM-A3	
Cm	476	20-dic-06	S	XN494 - XN495	26/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC932	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3743	CM-A2	
Cm	477	20-dic-06	S	XN251 - XN252	21/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC929	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3751	CM-A3	
Cm	478	20-dic-06	S	XP986 - XE131	21/08/2006	18/10/2006	crías	Anidación	XC936	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3752	CM-A2	
Cm	479	20-dic-06	S	AM262 - XC407	22/08/2006	19/10/2006	crías	Anidación	XC974	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3753	CM-A17	
Cm	480	20-dic-06	S	(FS698)J4686-XH830	28/08/2006	21/10/2006	crías	Anidación	XC976	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3754	CM-A22	
Cm	481	20-dic-06	S	XP831 - XP891	29/08/2006	24/10/2006	crías	Anidación	XC973	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4105	CM-A16	
Cm	482	20-dic-06	S	XH181 - XP976	28/08/2006	24/10/2006	crías	Anidación	XC988	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3755	CM-A16	
Cm	483	20-dic-06	S	KJ971 - XC427	30/08/2006	24/10/2006	crías	Anidación	XC980	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3756	CM-A22	
Cm	484	20-dic-06	S	XP821 - XP833	29/08/2006	25/10/2006	crías	Anidación	XC881	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3757	CM-A28	
Cm	485	20-dic-06	S	J3760 - XP851	01/09/2006	25/10/2006	crías	Anidación	XC889°	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3758	CM-A1.1	
Cm	486	20-dic-06	S	XP878 - XP876	03/09/2006	25/10/2006	crías	Anidación	XC884	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3759	CM-A17	
Cm	487	20-dic-06	S	KJ374 - XB852	22/09/2006	26/10/2006	crías	Anidación	XC970	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3760	CM-A17	
Cm	488	20-dic-06	S	XP397, XP867	28/08/2006	26/10/2006	crías	Anidación	XC886	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	25/06/2007	LCM15382/H950	4084	CM-A1.2	
Cm	489	20-dic-06	S	KJ766 - XM775	02/09/2006	28/10/2006	crías	Anidación	XC998	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3761	CM-A3	
Cm	490	20-dic-06	S	XN494 - XN495	01/09/2006	28/10/2006	crías	Anidación	XC994	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3762	CM-A2	
Cm	491	20-dic-06	S	J564 S - XC148	31/09/06	28/10/2006	crías	Anidación	XC987	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	04/05/2007	LCM15382/H950	3763	CM-A3	
Cm	492	20-dic-06	S	XP304 - XC402	30/09/2006	28/10/2006	crías	Anidación	XC969	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	09/05/2007	LCM15382/H950	3765	CM-A17	
Cm	493	20-dic-06	S	XP171 - XP881	28/09/2006	28/10/2006	crías	Anidación	XC965	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3807	CM-A3	
Cm	494	20-dic-06	S	XN443 - XP917	27/08/2006	28/10/2006	crías	Anidación	XC896	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3808	CM-A3	
Cm	495	20-dic-06	S	NA	05/09/2006	28/10/2006	crías	Anidación	XC87	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3809	CM-A17	
Cm	496	20-dic-06	S	XH825, XP333	NA	29/11/2006	crías	Anidación	NA	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3810	CM-A2	
Cm	497	20-dic-06	S	XM976, XP927	21/08/2006	20/11/2006	crías	Anidación	XC856	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3800	CM-A22	
Cm	498	20-dic-06	S	NA	18/08/2006	18/11/2006	crías	Anidación	XC746	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3835	CM-A2	
Cm	499	20-dic-06	S	NA	NA	NA	crías	Anidación	XC860	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3812	CM-A28	
Cm	500	20-dic-06	S	NA	NA	NA	crías	Anidación	XC865	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3801	CM-A28	
Cm	501	20-dic-06	S	NA	NA	NA	crías	Anidación	XC863	X' Cacel	Quintana Roo	Caribe	31/01/2007	10/05/2007	LCM15382/H950	3813	CM-A2	
Cm	127	24-nov-05	H/P	EK799, XB383	26/08/2005	17/07/2005	crías	Anidación	XH272	Xelha	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	22/03/2006	H950/LTEi9	3605	CM-A22	
Cm	130	24-nov-05	H/P	XN220, XN221	25/08/2005	17/07/2005	crías	Anidación	XH269	Xelha	Quintana Roo	Caribe	08/11/2005	23/08/2007	LCM15382/H950	4205	CM-A16	
Cm	619	21-dic-06	A	XN434 - XN433	05/07/2006	29/08/2006	crías	Anidación	XH109	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3746	NA	
Cm	620	21-dic-06	A	XH927	09/07/2006	29/08/2006	crías	Anidación	XH115	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3747	NA	
Cm	621	21-dic-06	A	XN291, XN292	06/07/2006	29/08/2006	crías	Anidación	XH112	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	03/05/2007	LCM15382/H950	3748	NA	
Cm	622	21-dic-06	A	XM790, XM791	09/07/2006	02/09/2006	crías	Anidación	XH118	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3944	NA	extraída mal con fenol
Cm	623	21-dic-06	A	XN291, XN292	18/07/2006	09/09/2006	crías	Anidación	XH151	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3945	NA	
Cm	624	21-dic-06	A	XN411, XN412	17/07/2006	09/09/2006	crías	Anidación	XH146	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3946	NA	
Cm	625	21-dic-06	A	XN469, XN466	19/07/2006	09/09/2006	crías	Anidación	XH153	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3947	NA	
Cm	626	21-dic-06	A	XN278, XN284	19/07/2006	09/09/2006	crías	Anidación	XH152	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3948	NA	
Cm	627	21-dic-06	A	XF193	22/07/2006	12/09/2006	crías	Anidación	XH171	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3949	NA	extraída mal con fenol
Cm	628	21-dic-06	S	XP391	30/07/2006	19/09/2006	crías	Anidación	XH193	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	629	21-dic-06	S	XP984, XP193	30/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XH189	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	630	21-dic-06	S	XP712	29/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XH187	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	631	21-dic-06	S	XK035, XC608	30/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XH197	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	632	21-dic-06	S	XP472	30/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XH194	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	633	21-dic-06	S	J4954, EB281	30/07/2006	20/09/2006	crías	Anidación	XH188	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	634	21-dic-06	S	XN491, XN490	31/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	XH200	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	635	21-dic-06	S	XN238, XN329	31/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	XH201	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	636	21-dic-06	S	XH285, XH285	31/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	XH199	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra

Prefijo num cat	Num cat	Fecha ingreso	Tej	# marca	Fecha desove	Fecha colecta	clave sexo	habitat	num nido	sitio	Estado	Región	Fecha extracción	Fecha PCR	Primers	Num PCR	d-loop hapl	observaciones
Cm	637	21-dic-06	S	XP578, XP579	31/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	XH198	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	638	21-dic-06	S	XK820, XC720	30/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	XH191	XELHA	Quintana Roo	Caribe	NA	NA	NA	NA	NA	No había muestra
Cm	639	21-dic-06	S	EK794	01/07/2006	21/09/2006	crías	Anidación	XH204	XELHA	Quintana Roo	Caribe	01/02/2007	23/05/2007	LCM15382/H950	3950	NA	
				A= Aleta														
				C= Corazón														
				H= Hígado														
				M= Musculo														
				S= Sangre														
				P=Plastrón														
				ND= no disponible														